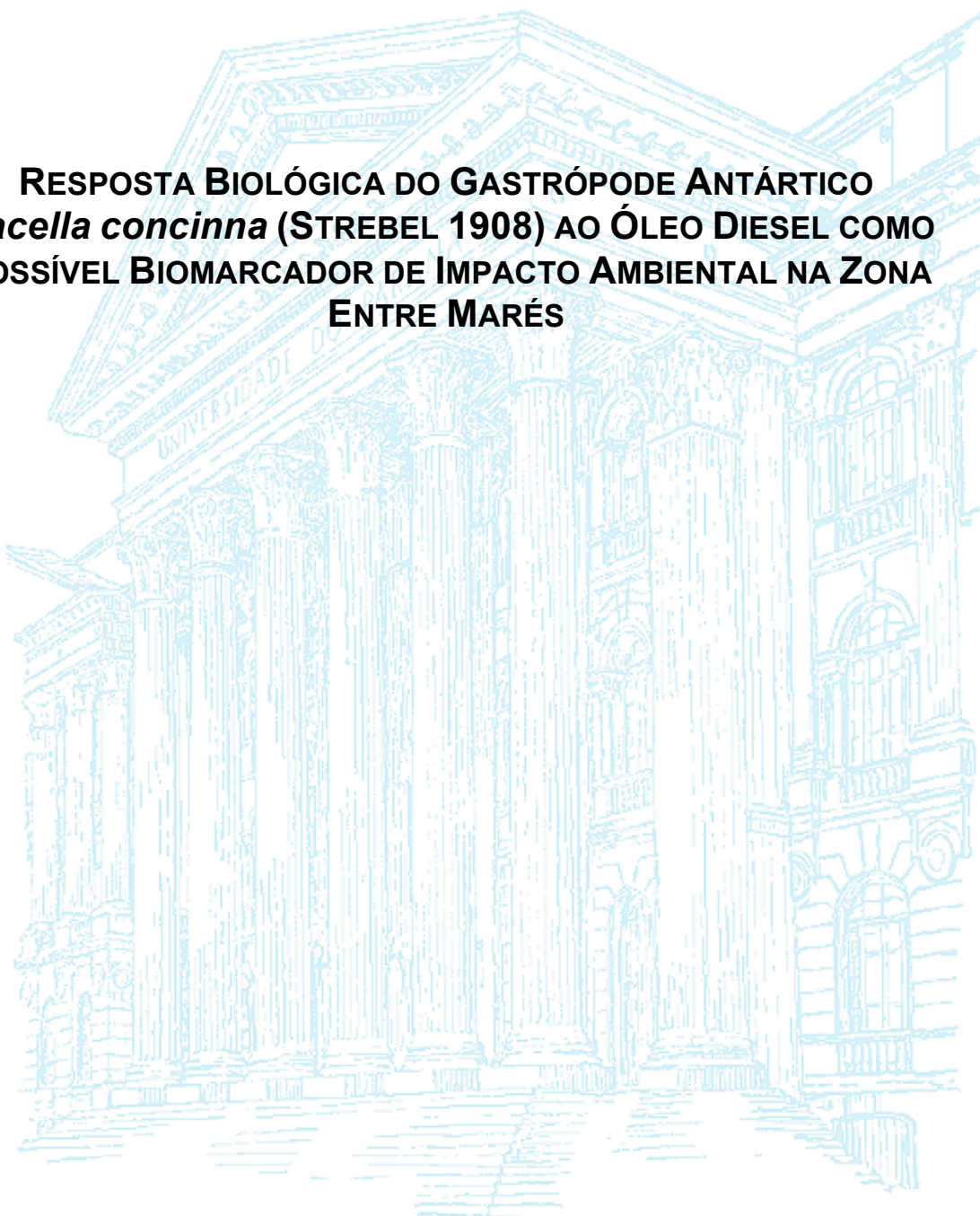


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA FEIJÓ DE OLIVEIRA

**RESPOSTA BIOLÓGICA DO GASTRÓPODE ANTÁRTICO
Nacella concinna (STREBEL 1908) AO ÓLEO DIESEL COMO
POSSÍVEL BIOMARCADOR DE IMPACTO AMBIENTAL NA ZONA
ENTRE MARÉS**



**CURITIBA
2013**

MARIANA FEIJÓ DE OLIVEIRA

**RESPOSTA BIOLÓGICA DO GASTRÓPODE ANTÁRTICO
Nacella concinna (STREBEL 1908) AO ÓLEO DIESEL COMO
POSSÍVEL BIOMARCADOR DE IMPACTO AMBIENTAL NA ZONA
ENTRE MARÉS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucélia Donatti
Coorientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues**

**CURITIBA
2013**

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Oliveira, Mariana Feijó de

Resposta biológica do gastrópode antártico *Nacella concinna* (STREBBEL 1908) ao óleo diesel como possível biomarcador de impacto ambiental na zona entre marés / Mariana Feijó de Oliveira. – Curitiba, 2013.

117 f.: il. color. ; 30cm.

Orientador: Lucélia Donatti

Coorientador: Edson Rodrigues

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Molusco 2. Biomarcadores I. Título II. Donatti, Lucélia III. Rodrigues, Edson IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

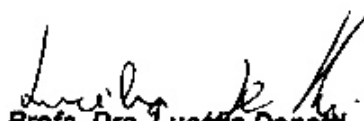
CDD (20. ed.) 639.4

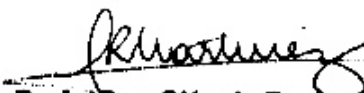
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR


Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Profa. Dra. Lucélia Donatti
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná


Profa. Dra. Gláucia Regina Martinez
Universidade Federal do Paraná - UFPR

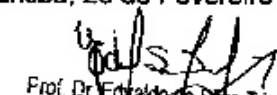

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Suplentes:

Profa. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a mestrande **Mariana Feijó de Oliveira**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Resposta biológica do gastrópode Antártico *Nacella concinna* (Strebel 1908) ao óleo diesel como possível biomarcadores de impacto ambiental na zona entre marés" são de parecer favorável à ~~aprovacao~~ da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 25 de Fevereiro de 2013


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

DEDICO

À minha mãe, Ana Neri, por toda a luta para me dar asas para voar em busca de meus sonhos.

À minha irmã, Tatiana, pela força, auxílio e presença nos momentos difíceis.

À minha avó, Terezinha, pelos cuidados e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu marido, Jaime, pela dedicação, paciência, companheirismo e compreensão.

Amo todos vocês!

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."
(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná pelo apoio no decorrer do mestrado.

À Universidade de Taubaté, por ceder o Laboratório de Bioquímica para a análise das amostras que compõem o presente estudo.

À Marinha do Brasil, pela contribuição na coleta e manutenção dos bioensaios, bem como no transporte do material biológico para o Brasil.

À SECIRM pelo apoio logístico durante toda a Operação Antártica.

Ao CNPq, pelo fomento indispensável para a realização desse trabalho.

À CAPES pela concessão de bolsa durante o curso de mestrado.

Ao INCT-APA pelo apoio na coleta das amostras utilizadas neste trabalho.

À Professora Dr^a. Lucélia Donatti, pela orientação e incentivo para a realização desse trabalho.

Ao Professor Dr. Edson Rodrigues, pela compreensão e paciência, pelos conhecimentos a mim passados com tanta dedicação, por reconhecer meu esforço e me oferecer grandes oportunidades.

Ao Professor Dr. Ciro Alberto de Oliveira pela disposição em sanar dúvidas, e pelas excelentes sugestões e apoio científico durante e após a realização dessa dissertação.

À Professora Dr^a. Gláucia Regina Martinez, pelas correções e sugestões apresentadas que contribuíram para a melhoria desse trabalho.

Ao meu marido e grande companheiro Jaime, por me compreender, acreditar em mim e me ajudar a correr atrás do que desejo.

À minha família, por estar sempre comigo, cuidando de mim e fazendo o possível para que eu possa ser feliz.

À minha mãe Ana, irmã Tatiana e avó Terezinha, que sempre me apoiaram e contribuíram muito para o meu crescimento pessoal e profissional, e também por acreditarem em mim e sempre me incentivarem.

À amiga e Técnica do Laboratório de Bioquímica Kelly Leal, pela paciência, apoio e companheirismo há tantos anos.

Aos amigos Ronaldo Merenda, Juliana Santos e Danielle Duarte, por sempre me ouvirem e incentivarem, bem como pelos momentos de descontração, fundamentais para aliviar a tensão em momentos difíceis.

Ao amigo Edson Rodrigues Júnior (Edinho), pela grande contribuição, que foi essencial para a realização desse trabalho, pelo auxílio durante a coleta e análise das amostras, pelos valiosos conselhos e apoio, sempre com disposição e boa vontade em me ajudar e tranquilizar nos momentos difíceis.

Aos amigos Camila Carvalho e Gustavo do Carmo por sempre a me ouvirem, ajudarem e apoiarem há tantos anos, bem como pelos valiosos conselhos que me ajudaram em diversos momentos.

Aos amigos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, André Lanna, pelos momentos de descontração, companheirismo, e conversas, e Maria Isabel Figueiredo (Bel), pelo companheirismo, e contribuição nos cuidados com as nossas “Nacellindas”.

Aos amigos Danilo Eugênio e Maria Rosa Pedreiro da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio e apoio desde antes do início do mestrado.

Aos estagiários do Laboratório de Bioquímica Keilah Netto, Maria Eloy, Mariana Souza e Gustavo Salles pelo auxílio e pelos momentos de descontração.

À Professora Dr^a. Helena Passeri Lavrado, pelo auxílio, incentivo e sugestões valiosas que ajudaram a enriquecer essa dissertação.

Às Professoras do Laboratório de Bioquímica Dr^a. Gannabathula Sree Vani por estar sempre disposta a me ensinar e apoiar, e Dr^a. Cecília Suda, pela contribuição científica.

À Professora Dr^a. Ana Gobbo, pelos conselhos e incentivo para o meu ingresso no mestrado.

Ao Professor Dr. Francisco Filipak da Universidade Federal do Paraná, que gentilmente cedeu a bibliografia e os protocolos utilizados em seu laboratório, que foram imprescindíveis para o estabelecimento de algumas das metodologias utilizadas nesse trabalho, bem como pela disposição em sanar as dúvidas.

À bibliotecária da Biblioteca de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná Karolayne Lima, por gentilmente sanar todas as dúvidas sobre as normas para a confecção dessa dissertação.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização dessa dissertação.

RESUMO

A Antártica é considerada a região mais preservada do planeta, embora venha sofrendo os impactos da presença humana na região. A queima e o vazamento de combustível fóssil na Antártica têm impactado seus ecossistemas, o que tem suscitado preocupações e motivado pesquisas na área de monitoramento ambiental. O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito do óleo diesel, em quatro diferentes condições termo-salinas (0 e 4°C, e 35 e 25psu), sobre as respostas metabólicas do gastrópode antártico *Nacella concinna*, e o potencial uso dessas respostas como biomarcadores de poluição por diesel na zona entre marés. As atividades das enzimas glutathione redutase (GR), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), lactato desidrogenase (LDH), citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH), e arginase (ARG), foram determinadas nas brânquias e pé muscular. Os níveis de GR, SOD, CAT e glutathione S-transferase (GST), bem como lipoperoxidação (LPO) e carbonilação proteica (PCO), como marcadores de lesão oxidativa, foram determinados na glândula digestiva. A exposição ao óleo diesel modulou: a) positivamente os níveis de GR, SOD e LPO viscerais, GR branquial, CAT e HK muscular; b) negativamente os níveis de CAT e G6PDH branquial, bem como SOD, G6PDH e ARG no pé muscular. Grande parte das enzimas analisadas na glândula digestiva, brânquias e pé muscular de *N. concinna* foram moduladas por aquecimento, baixa salinidade, bem como por interações entre esses fatores e o diesel. Comparando os níveis enzimáticos dos animais do controle experimental com os do referencial da natureza, constatamos que diversas enzimas foram moduladas de forma distinta nesses dois grupos. Dentre as enzimas da defesa antioxidante analisadas, somente a GR branquial apresentou potencial biomarcador de exposição ao diesel. Já em relação ao metabolismo energético, apenas a HK muscular despontou como potencial biomarcador de exposição ao diesel.

Palavras-chave: *Nacella concinna*. Biomarcadores. Antártica. Óleo diesel.

ABSTRACT

Antarctica is considered the most pristine region of the planet, despite of the environmental impacts due to the development of human activities. The spillage and combustion of fossil fuel in Antarctica has raised concerns about its impact on ecosystems and motivated research on environmental monitoring. This study investigates the effect of diesel on the metabolic response of the Antarctic gastropod *Nacella concinna*, under four different thermo-saline conditions (0 and 4°C, 25 and 35psu), and the potential use of these responses as a biomarkers of diesel pollution in the intertidal zone. The activity of the enzymes hexokinase (HK), phosphofructokinase (PFK), lactate dehydrogenase (LDH), malate dehydrogenase (MDH), citrate synthase (CS), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), glutathione reductase (GR) and arginase (ARG) were determined in gills and foot muscle. The levels of GR, SOD, CAT and glutathione S-transferase (GST), as well as lipid peroxidation (LPO) and protein carbonylation (PCO), as oxidative damage markers, were determined in the digestive gland. Exposure of the gastropods to diesel modulated: a) positively the levels of GR, SOD and LPO in the digestive gland, GR in the gills, CAT and HK in the foot muscle; b) negatively the levels of CAT and G6PDH in the gills, as well as SOD, G6PDH and ARG in the foot muscle. Warming, low salinity, as well as interactions between these factors with diesel, modulated most of the enzymes analyzed in digestive gland, gills and foot muscle of *N. concinna*. Comparing the enzymatic levels of the experimental controls with the nature reference, it was found that many enzymes were distinctly modulated in both groups. Among the antioxidant defense enzymes analyzed, only GR in the gills showed potential as biomarker of diesel exposure. In relation to the energy metabolism, only muscular HK showed potential as a biomarker of diesel exposure.

Keywords: *Nacella concinna*. Biomarkers. Antarctica. Diesel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da Antártica mostrando a área de abrangência da Corrente Circumpolar Antártica (ACC) e o isolamento térmico e biogeográfico do oceano Austral.....	19
Figura 2. Localização geográfica da Ilha Rei George e Baía do Almirantado	22
Figura 3. Gastrópode <i>Nacella concinna</i> aderido às rochas da zona entre marés durante a maré baixa.....	28
Figura 4. Diferenças Morfológicas das Conchas de <i>Nacella concinna</i>	29
Figura 5. Esquematização das vias metabólicas com as reações catalisadas pelas enzimas analisadas no presente estudo	36
Figura 6. Solo no entorno dos reservatórios de óleo diesel da Estação Antártica Comandante Ferraz	38
Figura 7. Vista dorsal e ventral de <i>Nacella concinna</i>	39
Figura 8. Mapa esquemático da Península Antártica, Ilha Rei George e Baía do Almirantado.....	40
Figura 9. Banho-maria ultratermostatizado	41
Figura 10. Modelo esquemático dos aquários inseridos nos banhos-marias refrigerados	41
Figura 11. Níveis enzimáticos da defesa antioxidante e marcadores de lesão oxidativa da glândula digestiva de <i>Nacella concinna</i>	48
Figura 12. Níveis enzimáticos da defesa antioxidante, metabolismo arginínolítico e energético das brânquias de <i>Nacella concinna</i>	49

Figura 13. Níveis enzimáticos da defesa antioxidante, metabolismo argininolítico e energético do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	50
Figura 14. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de GR da glândula digestiva de <i>Nacella concinna</i>	51
Figura 15. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de SOD da glândula digestiva de <i>Nacella concinna</i>	52
Figura 16. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de CAT da glândula digestiva de <i>Nacella concinna</i>	53
Figura 17. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de GST da glândula digestiva de <i>Nacella concinna</i>	54
Figura 18. Efeito do óleo diesel na peroxidação lipídica (LPO) da glândula digestiva de <i>Nacella concinna</i>	55
Figura 19. Efeito do óleo diesel na carbonilação de proteínas (PCO) da glândula digestiva de <i>Nacella concinna</i>	56
Figura 20. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de GR das brânquias de <i>Nacella concinna</i>	58
Figura 21. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de SOD das brânquias de <i>Nacella concinna</i>	59
Figura 22. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de CAT das brânquias de <i>Nacella concinna</i>	60
Figura 23. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de G6PDH das brânquias de <i>Nacella concinna</i>	61
Figura 24. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de HK das brânquias de <i>Nacella concinna</i>	62
Figura 25. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de PFK das brânquias de <i>Nacella concinna</i>	63

Figura 26. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de LDH	
das brânquias de <i>Nacella concinna</i>	64
Figura 27. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de CS	
das brânquias de <i>Nacella concinna</i>	65
Figura 28. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de MDH	
das brânquias de <i>Nacella concinna</i>	66
Figura 29. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de ARG	
das brânquias de <i>Nacella concinna</i>	67
Figura 30. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de SOD	
do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	69
Figura 31. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de CAT	
do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	70
Figura 32. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de G6PDH	
do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	71
Figura 33. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de HK	
do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	72
Figura 34. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de PFK	
do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	73
Figura 35. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de LDH	
do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	74
Figura 36. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de CS	
do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	75
Figura 37. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de MDH	
do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	76
Figura 38. Efeito do óleo diesel sobre os níveis de ARG	
do pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de <i>Nacella concinna</i> vivas ao final do período experimental.....	47
Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos nos parâmetros analisados na glândula digestiva de <i>Nacella concinna</i>	57
Tabela 3. Resumo dos resultados obtidos dos parâmetros analisados nas brânquias de <i>Nacella concinna</i>	68
Tabela 4. Resumo dos resultados obtidos nos parâmetros analisados no pé muscular de <i>Nacella concinna</i>	78

LISTA DE ABREVIATURAS

0-25	0°C, 25psu
025C	0°C, 25psu, controle sem diesel
025D1%	0°C, 25psu, com diesel a 1%
025D5%	0°C, 25psu, com diesel a 5%
0-35	0°C, 35psu
035C	0°C, 35psu, controle sem diesel
035D1%	0°C, 35psu, com diesel a 1%
035D5%	0°C, 35psu, com diesel a 5%
4-25	4°C, 25psu
425C	4°C, 25psu, controle sem diesel
425D1%	4°C, 25psu, com diesel a 1%
425D5%	4°C, 25psu, com diesel a 5%
4-35	4°C, 35psu
435C	4°C, 35psu, controle sem diesel
435D1%	4°C, 35psu, com diesel a 1%
435D5%	4°C, 35psu, com diesel a 5%
6-PGDH	6-fosfogliconato desidrogenase (6-Phosphogluconate dehydrogenase)
α -KG	α -cetogluturato (α -ketoglutarate)
ACC	Corrente Circumpolar Antártica (Antarctic Circumpolar Current)
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ALD	Aldolase
AMP	Adenosina Monofosfato
ANOVA	Análise de Variância
ARG	Arginase
ASMA	Área Antártica Especialmente Gerenciada (Antarctic Specially Managed Area)
ATP	Adenosina Trifosfato
BaP	Benzo[a]pireno
BCA	Ácido Bincicônico (Bicinchoninic Acid)
BHT	Hidroxitolueno Butilado (Butylated Hydroxytoluene)

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
CDNB	1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
CIRM	Comissão Interministerial para os Recursos do Mar
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CS	Citrato Sintase
DHAP	Diidroxiacetona-Fosfato (<i>Dihydroxyacetone Phosphate</i>)
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina (<i>2,4-Dinitrophenylhydrazine</i>)
DTNB	Ácido 5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzoico (<i>5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)</i>)
EACF	Estação Antártica Comandante Ferraz
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
EROD	<i>Ethoxyresorufin-O-deethylase</i>
EUA	Estados Unidos da América
F-1,6-P ₂	Frutose-1,6-bisfosfato (<i>Fructose 1,6-bisphosphate</i>)
F-6-P	Frutose-6-fosfato (<i>Fructose-6-phosphate</i>)
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FOX	<i>Ferrous Oxidation in Xylenol Orange</i>
G-6-P	Glicose-6-fosfato (<i>Glucose-6-Phosphate</i>)
G6PDH	Glicose-6-fosfato Desidrogenase (<i>Glucose-6-phosphate Dehydrogenase</i>)
GAP	Gliceraldeído-3-Fosfato (<i>Glyceraldehydes-3-Phosphate</i>)
GPDH	Glicerol-3-fosfato desidrogenase (<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase</i>)
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa Reduzida
GSSG	Glutationa Oxidada
GST	Glutationa S-Transferase
HK	Hexoquinase (<i>Hexokinase</i>)
HNE	4-hidroxi-2-nonenal

HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
INCT-APA	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Pesquisas Ambientais
LDH	Lactato Desidrogenase (<i>Lactate Dehydrogenase</i>)
LPO	Peroxidação de Lipídeos (<i>Lipid Peroxidation</i>)
MCTI	Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação
MDA	Malondialdeído
MDH	Malato Desidrogenase (<i>Malate Dehydrogenase</i>)
ME	Enzima Málica (<i>Malic Enzyme</i>)
MMA	Ministério do Meio Ambiente
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – Forma Oxidada
NADH+H ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – Forma Reduzida
NADP ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato – Forma Oxidada
NADPH+H ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato – Forma Reduzida
NBT	<i>Nitro-blue tetrazolium</i>
NOS	Óxido Nítrico Sintase (<i>Nitric Oxide Synthase</i>)
PCO	Carbonilação de Proteínas (<i>Protein Carbonylation</i>)
PFK	Fosfofrutoquinase (<i>Phosphofructokinase</i>)
Pi	Fosfato
PP	Punta Plaza
PROANTAR	Programa Antártico Brasileiro
PSU	Unidade Prática de Salinidade (<i>Practical Salinity Unity</i>)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SOD	Superóxido Dismutase
TCA	Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (<i>Tricarboxylic Acid Cycle</i>)
TPI	Triose Fosfato Isomerase (<i>Triose-Phosphate Isomerase</i>)
U	Unidade Internacional de Enzimas
UV	Ultra violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. O Continente Antártico	18
1.2. Ilha Rei George	21
1.3. Combustíveis Fósseis	22
1.4. Os Desafios da Vida na Zona Entre Marés	25
1.5. <i>Nacella concinna</i> (Strebel, 1908)	28
2. OBJETIVOS	37
3. JUSTIFICATIVA.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Recursos e Apoio Logístico.....	39
4.2. Material Biológico	39
4.3. Protocolo Experimental	40
4.4. Análises Bioquímicas	42
4.4.1. Homogeneizados Livres de Células	42
4.4.2. Determinação das Atividades Enzimáticas	43
4.4.3. Peroxidação de Lipídeos	46
4.4.4. Carbonilação de Proteínas	46
4.5. Análises Estatísticas	46
5. RESULTADOS	47
5.1. Controle Experimental vs Referencial da Natureza.....	48
5.2. Glândula Digestiva	51
5.3. Brânquias	57
5.4. Pé Muscular.....	68
6. DISCUSSÃO	79
6.1. Defesa Antioxidante	79
6.1.1. Controle Experimental vs Referencial da Natureza	79
6.1.2. Efeito do diesel, temperatura e salinidade sobre a defesa antioxidante e marcadores de lesões oxidativas	80
6.2. Metabolismo Energético	89
6.2.1. Controle Experimental vs Referencial da Natureza	89

6.2.2. Efeito de diesel, temperatura e salinidade sobre o metabolismo energético	91
6.3. Metabolismo Arginínolítico.....	94
6.3.1. Controle Experimental vs Referencial da Natureza	94
6.3.2. Efeito do diesel, temperatura e salinidade sobre o metabolismo arginínolítico	96
7. CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

1. INTRODUÇÃO

A percepção da Antártica como um laboratório natural único e essencial para pesquisas envolvendo processos evolutivos, ecológicos e fisiológicos (CLARKE, JOHNSTON, *et al.*, 2007), bem como para o sistema climático global (MASSOM & STAMMERJOHN, 2010), tem despertado o interesse da comunidade científica e da população em geral. A presença humana na região aumentou expressivamente nos últimos 50 anos, suscitando preocupações que resultaram na assinatura do Protocolo de Proteção Ambiental, em 1991, pelas partes consultivas do Tratado da Antártica, o qual define esse Continente como uma reserva natural dedicada à paz e à pesquisa (BARGAGLI, 2008; TIN *et al.*, 2009)

A ausência de uma população nativa, as condições climáticas adversas e o isolamento físico protegeram a Antártica dos impactos antrópicos de origem local e dificultaram a exploração dos seus recursos vivos (BARGAGLI, 2008). Contudo, nas últimas décadas, as águas antárticas foram regularmente cruzadas com maior frequência por navios de pesca, turismo e de apoio logístico às estações científicas, aumentando significativamente a quantidade de óleos diesel e lubrificante lançados ao mar e depositados no litoral pela ação das correntes marinhas (MICHAUD *et al.*, 2004). Os riscos de vazamento de óleo diesel e o seu impacto sobre a fauna antártica, têm gerado grande preocupação e motivando estudos sobre o efeito do óleo diesel na biota local, como por exemplo, o gastrópode *Nacella concinna* (KENNICUTT II *et al.*, 1992b; ANSALDO *et al.*, 2005).

1.1. O Continente Antártico

Há cerca de 500 milhões de anos, a Antártica era parte do supercontinente Gondwana, que existiu durante o Paleozóico. No Mesozóico, a fragmentação desse supercontinente originou a América do Sul, África, Índia e Austrália que se deslocaram em direção oposta à Antártica, a qual permaneceu em latitude elevada e derivou lentamente até atingir a sua posição atual há mais de 100 milhões de anos (FITZSIMONS, 2000; PECK *et al.*, 2006)

Apesar de sua posição polar, acredita-se que a Antártica permaneceu sem gelo, com vegetação, e temperaturas anuais acima de 0°C durante um longo período. Contudo, o clima quente do Cretáceo foi gradativamente mudando e durante o Eoceno, há 42 milhões de anos, começou a esfriar e a Antártica vivenciou ciclos de glaciação, marcados pela presença de uma camada de gelo permanente que se formou há cerca de 34 milhões anos (TRIPATI *et al.*, 2005; ROGERS, 2007; SIEGERT & FLORINDO, 2008).

Com a abertura da passagem de Drake, há cerca de 25 milhões de anos, a Austrália e a América do Sul ficaram fisicamente isoladas da Antártica, e se estabeleceu uma forte corrente oceânica superficial, denominada de Corrente Circumpolar Antártica - ACC (FIGURA 1), onde o fluxo de água deixou de ser norte-sul, em direção aos oceanos Pacífico, Atlântico e Índico, para se tornar um fluxo oeste-leste ao redor da Antártica. Como consequência, a região antártica tornou-se ainda mais fria devido a redução de transferência de calor entre o Equador e o pólo sul, acentuando a formação do gelo marinho (KENNETT, 1977; BARRETT, 2003). Somado ao surgimento da ACC, o declínio do CO₂ atmosférico também contribuiu fortemente para explicar as sucessivas glaciações Antárticas e as baixas temperaturas (DECONTO & POLLARD, 2003).

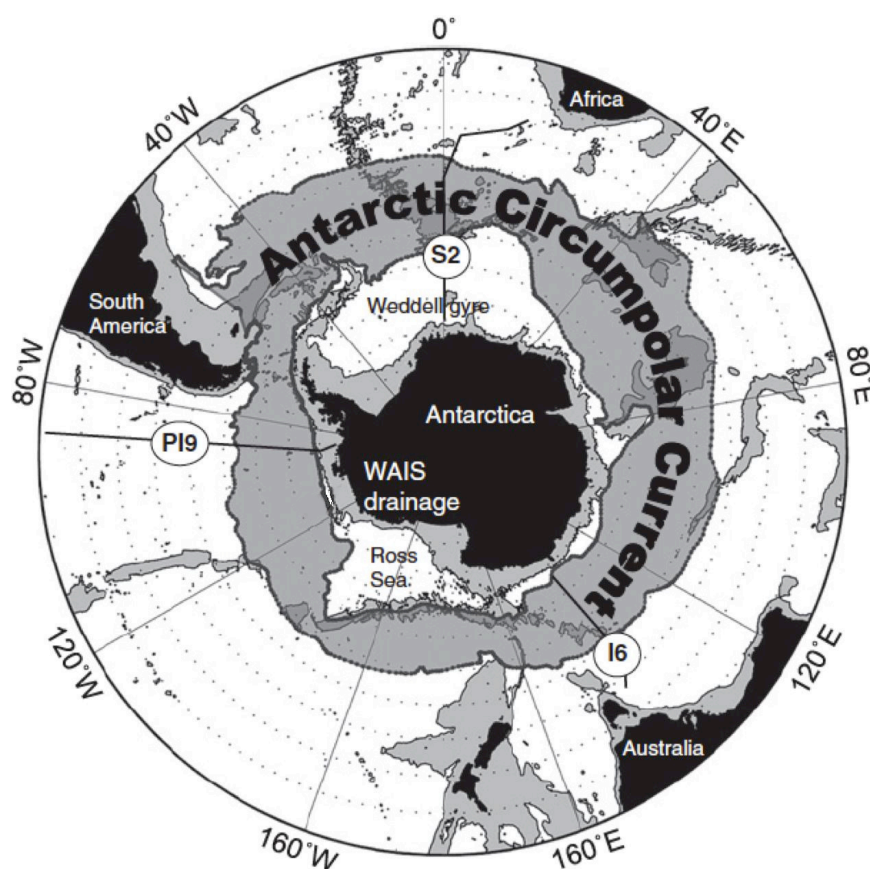


FIGURA 1. MAPA DA ANTÁRTICA MOSTRANDO A ÁREA DE ABRANGÊNCIA DA CORRENTE CIRCUMPOLAR ANTÁRTICA (ACC) E O ISOLAMENTO TÉRMICO E BIOGEOGRÁFICO DO OCEANO AUSTRAL.
FONTE: ADAPTADO DE MARTINSON (2012).

O isolamento biogeográfico do Oceano Austral pela ACC fez com que a fauna Antártica evoluísse isoladamente e sob a pressão seletiva de temperaturas baixas e estáveis (CLARKE *et al.*, 2005). As temperaturas baixas e sazonalidade extrema dos ciclos luminosos tornaram o ambiente natural da plataforma continental antártica desafiador em termos de adaptações biológicas, resultando em um elevado endemismo de espécies (BARNES & PECK, 2008).

Em latitudes elevadas, a temperatura da água do mar no entorno do continente antártico fica próxima do equilíbrio térmico entre o gelo marinho e a água do mar ($-1,8^{\circ}\text{C}$). Em algumas regiões na costa do Continente, a flutuação anual da temperatura varia menos de $0,2^{\circ}\text{C}$. A Península Antártica e Ilhas adjacentes experimentam um processo de aquecimento acelerado imposto pelas alterações climáticas globais. Mas, mesmo assim, a janela térmica na água do mar não excede $3,5^{\circ}\text{C}$ (CLARKE *et al.*, 1988; PECK *et al.*, 2006). No ambiente terrestre, na maior parte do continente antártico, a temperatura do ar permanece abaixo de zero (PECK *et al.*, 2006) e em 1983 foi registrada a temperatura mais baixa do planeta ($-89,2^{\circ}\text{C}$), em local próximo da estação russa de Vostok (BUDRETSKI, 1984).

Com uma cobertura de gelo permanente de 99%, com espessura que ultrapassa 4 km em alguns pontos, a Antártica é o único continente que não apresenta uma longa história de ocupação antrópica, sendo reconhecida como um lugar remoto e hostil, bem como símbolo do último grande deserto intocado pela perturbação humana (PECK *et al.*, 2006; BARGAGLI, 2008).

Apesar de existirem evidências da presença de tribos aborígenes da Terra do Fogo na região do Arquipélago das Ilhas Shetland do Sul, o primeiro registro histórico de presença humana na região é creditada ao Capitão James Cook que circum navegou a Antártica em 1774-1775 (BONNER, 1987). Por um longo tempo, o isolamento e as condições adversas desencorajaram a exploração do continente gelado, porém no início do século XX, motivado por interesses econômicos, a presença humana na região aumentou e a caça de baleias e focas levou algumas espécies ao limiar da extinção (GAMBELL, 1987; BARGAGLI, 2008).

O Ano Geofísico Internacional de 1957-1958, por ocasião do Terceiro Ano Polar (o primeiro foi em 1882-1883, e o segundo em 1932-1933), foi marcado pelo esforço internacional na coleta de dados geofísicos do planeta, dando início ao monitoramento de dióxido de carbono atmosférico e da dinâmica glacial, além de abrigar as discussões que resultaram na elaboração e assinatura do Tratado da Antártica (KORSMO, 2007).

As partes consultivas do Tratado da Antártica reconhecem a região como uma reserva natural que deve ser estudada com propósitos pacíficos, e não deve ser a cena ou objeto de discórdia internacional. A liberdade científica de investigação tem encorajado trabalhos cooperativos entre os países com interesses técnicos e científicos na Antártica (COHEN, 2002).

Contudo, as atividades científicas, o turismo e a pesca nos últimos 50 anos aumentaram o contingente humano na Antártica (BARGAGLI, 2008) e passaram a

protagonizar as principais atividades antrópicas na região, principalmente naquilo que diz respeito à queima de combustível fóssil (AISLABIE *et al.*, 1999).

O interesse da comunidade científica e do público em geral aumentou devido às características únicas da Antártica e da sua importância para os estudos de mudanças climáticas. Contudo, o aumento do ecoturismo e das visitas ao continente elevou o risco de vazamentos de combustíveis (WOOLFENDEN *et al.*, 2011).

O vazamento de óleo dos navios *Exxon Valdez* em Prince William Sound, Alasca, e do quebra gelo *Bahia Paraíso* em Arthur Harbor, Antártica, ambos em 1989, chamou a atenção da população mundial para o impacto das atividades humanas nos ambientes polares (MCDONALD *et al.*, 1992). Em 1991, as partes consultivas do Tratado Antártico reconheceram a necessidade de ampliar a proteção ambiental da Antártica, ratificando o Protocolo de Proteção Ambiental para o Tratado Antártico, que recomenda um abrangente regime de gestão ambiental (AISLABIE *et al.*, 2004).

1.2. Ilha Rei George

A Ilha Rei George é a maior do Arquipélago das Shetlands do Sul (FIGURA 2) e está localizada a 62°02'S e 58°21'W. A região apresenta um clima tipicamente marítimo, com pequenas variações na temperatura atmosférica durante o ano, umidade relativa alta e constante cobertura de nuvens (FERRON *et al.*, 2004). A Área Antártica Especialmente Gerenciada (ASMA#1) da Baía do Almirantado, com 362 Km² (BRAUN *et al.*, 2001), é a maior Baía da Ilha Rei George e do Arquipélago das Shetlands do Sul (RAKUSA-SUSZCZEWSKI, 1995).

Durante os meses mais quentes do ano, a Ilha Rei George apresenta temperatura do ar entre 0° a 10°C, com média anual de -1,8°C. A velocidade média anual dos ventos é 21 km/h, com rajadas que chegam a 176 km/h, e a temperatura do solo não coberto por gelo pode chegar aos 5°C no verão (SETZER *et al.*, 2004).

Com área superficial de 1.150 Km², a Ilha Rei George abriga instalações científicas de doze Países, incluindo a estação antártica brasileira Comandante Ferraz (EACF). As logísticas das estações científicas normalmente demandam a presença de aeronaves e navios na região, bem como a queima de combustível fóssil. Martins *et al.* (2004), analisando sedimentos marinhos da Baía do Almirantado coletados em pontos distantes da EACF, verificaram que as concentrações de hidrocarbonetos eram baixas e com valores semelhantes aos de locais preservados na Antártica. Contudo, no infralitoral próximo à EACF, o sedimento marinho se apresenta contaminado com hidrocarbonetos derivados de óleo combustível.

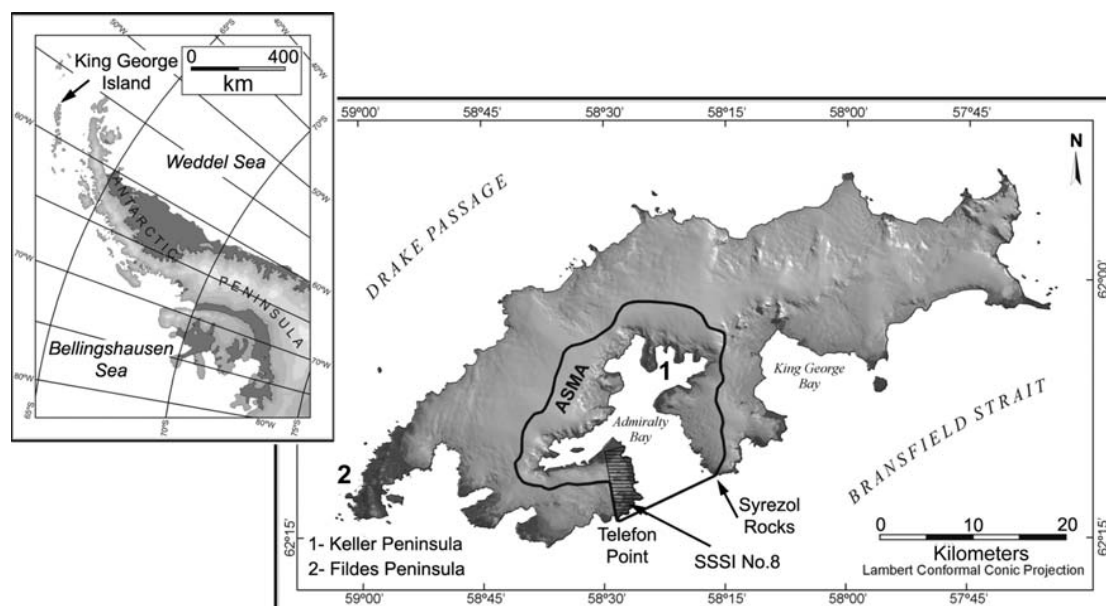


FIGURA 2. LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA ILHA REI GEORGE E BAÍA DO ALMIRANTADO. LOCALIZADA NO EXTREMO NORTE DA PENÍNSULA ANTÁRTICA, A ILHA REI GEORGE ABRIGA A ÁREA ESPECIALMENTE GERENCIADA DA BAÍA DO ALMIRANTADO (ASMA#1).

FONTE: EXTRAÍDO DE ARIGONY-NETO *et al.* (2004).

Estudos com organismos antárticos da zona entre marés e do infralitoral de Marian Cove na Ilha Rei George, também apontaram a queima de combustível fóssil e vazamentos de óleo com as principais fontes poluidoras da região (AHN *et al.*, 2004).

1.3. Combustíveis Fósseis

A preservação ambiental contrasta com as atividades humanas na Antártica, na qual as estações científicas dependem fortemente da queima de combustível fóssil e derivados do petróleo. O abastecimento de estações litorâneas é realizado por navios polares e os sistemas de transferência de combustíveis frequentemente proporcionam pequenos vazamentos no litoral (MCDONALD *et al.*, 1992; POWELL *et al.*, 2005).

A poluição por óleo tem se tornado uma questão ambiental global e uma ameaça aos ecossistemas oceânicos. A avaliação e a predição dos efeitos poluentes de óleos combustíveis no ambiente aquático tem se tornado uma questão urgente e importante (ZHANG *et al.*, 2004)

Os efeito deletérios dos derivados do petróleo e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos pode levar os organismos a morte, comprometendo o funcionamento de sistemas fisiológicos como a reprodução, crescimento, defesa, bem como alterando a função endócrina e induzindo malformações, câncer, desordens sanguíneas, tumores, lesões, alterações comportamentais, entre outros (HOFFMAN *et al.*, 2001).

A morte de organismos marinhos também pode ocorrer pelo contato direto/revestimento com óleo que mata por asfixia; adicionalmente, a incorporação de quantidades sub-letais de óleo e seus produtos pode resultar em resistência reduzida a infecções e outros tipos de estresses, capazes de comprometer a sobrevivência de espécies marinhas e das que estão em níveis superiores da cadeia alimentar (GIN *et al.*, 2001).

A toxicidade aguda do óleo combustível sobre a biota da zona entre marés tem sido atribuída ao seu efeito sufocante. Já o efeito crônico pode reduzir o número de espécies da comunidade e dificultar a recolonização de áreas contaminadas. O estresse decorrente do acúmulo de óleo pode não ser imediatamente fatal, mas isso pode impedir o crescimento e a reprodução de organismos susceptíveis (FUKUYAMA *et al.*, 2000).

Em ecossistema marinho, os vazamentos de óleo representam a maior ameaça ambiental, considerando que a contenção é difícil e o óleo pode impactar grandes áreas, e mesmo vazamentos em pequena escala podem ter efeito substancial na biota marinha local (HANNAM *et al.*, 2010). A identificação de respostas biológicas (biomarcadores) capazes de detectar precocemente a exposição da biota ao óleo combustível, em especial no que diz respeito aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), tem sido conduzida no âmbito da defesa antioxidante e do metabolismo de xenobióticos (LAM & GRAY, 2003; LAM, 2009).

Nahrgang *et al.* (2010) verificaram que no peixe ártico *Boreogadus saida*, exposto a três diferentes concentrações de fração solúvel de petróleo bruto, os níveis hepáticos das enzimas *ethoxyresorufin-O-deethylase* (EROD) e glutathione S-transferase tiveram aumento de atividade, enquanto a atividade da catalase diminuiu.

Lavarías *et al.* (2011) avaliaram o efeito da fração solúvel de hidrocarbonetos no metabolismo antioxidante do camarão de água doce *Macrobrachium borellii* e concluíram que após sete dias expostos a concentrações sub-letais, o crustáceo apresentou aumento significativo nas atividades das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione S-transferase, além de aumento na peroxidação de lipídeos e diminuição de glutathione reduzida no hepatopâncreas.

Em moluscos, como o bivalve *Chlamys islandica*, a exposição aguda ao diesel causa redução da capacidade imunológica, com significativo comprometimento de fagócitos e da estabilidade da membrana celular, além de

levar ao estresse oxidativo, com uma significativa redução nos níveis de glutathione e elevação dos níveis de peroxidação de lipídeos (HANNAM *et al.*, 2010).

Estudo com o gastrópode *Austrocochlea porcata*, da zona entre marés australiana, revelou que a enzima glutathione peroxidase da massa visceral é uma forte candidata a biomarcador de toxicidade por exposição subletal ao petróleo, considerando que a sua indução pela fração acomodada de petróleo bruto foi dose dependente (REID & MACFARLANE, 2003).

O óleo diesel é o combustível mais utilizado na Antártica e pode permanecer na superfície da água, representando um risco direto de contaminação do plâncton, assim como de organismos que habitam a região costeira (ANSALDO *et al.*, 2005). Os navios que suprem a maioria das estações científicas, juntamente com as substanciais frotas pesqueiras e navios de turismo, são provavelmente os que oferecem os maiores perigos de poluição marinha na Antártica; o naufrágio do quebra gelo *Bahia Paraíso* próximo a estação científica Palmer (EUA), na Ilha Anvers, em janeiro de 1989, resultou no vazamento de aproximadamente 600 m³ de óleos no mar, principalmente diesel e combustível de aviação, contaminando o litoral de todas as ilhas de Arthur Harbor e da Baía Biscoe (CRIPPS & PRIDDLE, 1991; CRIPPS & SHEARS, 1997).

Estima-se que o naufrágio do *Bahia Paraíso* resultou na morte de 300 aves marinhas contaminadas por óleo, sendo a maioria pingüins Adelie (*Pygoscelis adeliae*) e biguá de olhos azuis (*Phalacrocorax atriceps*); as populações do gastrópode *Nacella concinna* da zona entre marés foram reduzidas em 50% após o vazamento e uma recuperação parcial foi observada após um ano (CRIPPS & SHEARS, 1997).

Fiala & Delille (1999) verificaram que a contaminação do gelo marinho por petróleo bruto e óleo diesel, no litoral da Terre Adélie na Antártica, resultou em um efeito negativo sobre o crescimento das microalgas de gelo. No gelo marinho não contaminado, a concentração de clorofila a teve máximo aumento em abril, atingindo níveis de 50 mg m⁻³ durante a formação de gelo marinho. Já no local contaminado por diesel, a biomassa de clorofila a permaneceu em torno de 1 mg m⁻³ durante todo o período com cobertura de gelo. Em contraste, o efeito inibidor do petróleo bruto não foi imediato, e no início da formação do gelo, houve um aumento de clorofila a, porém em intensidade menor do que na área controle, com máxima concentração de 20 mg m⁻³.

Bioensaios com hidrocarbonetos têm ajudado a prever os efeitos de poluentes derivados do petróleo sobre as respostas biológicas de organismos

antárticos. Benedetti *et al.* (2007), estudando os efeitos do benzo[a]pireno (BaP) no peixe antártico *Trematomus bernacchii*, verificaram que o BaP é capaz de elevar a atividade das enzimas *ethoxyresorufin O-deethylase* (EROD) e glutathione peroxidase no fígado. A exposição de embriões de *Pleuragramma antarcticum* ao BaP, em baixas concentrações durante 24 h, revelou que esse peixe antártico apresenta baixa capacidade metabólica para esse composto, marcada pelo acúmulo de BaP nos tecidos e pela baixa capacidade de indução de enzimas do citocromo P450 (REGOLI *et al.*, 2005).

1.4. Os Desafios da Vida na Zona Entre Marés

A zona entre marés, ou zona litorânea, corresponde à parte do mar que fica entre o maior e menor nível de água durante o ciclo das marés. A biota habitante dessa região é adaptada a um ambiente dinâmico, dominado pelo ciclo das marés, com períodos de inundações e retrações da água (WIDDOWS & BRINSLEY, 2002).

A maioria dos habitantes da zona entre marés são organismos essencialmente aquáticos, portanto, a exposição ao ar pode levar à perda de água por evaporação e, eventualmente, à morte por desidratação. Portanto, esses organismos devem ser capazes de retardar a perda de água o suficiente para permitir a sobrevivência nos períodos de maré baixa, quando ficam expostos, em especial quando a exposição ao ar vem acompanhada de sol ou vento, que aumentam ainda mais o risco de dessecação. A ação das ondas é outro fator limitante para a vida na zona entre marés, já que água com pedras e outros materiais em suspensão são arremessados contra os habitantes da região. Consequentemente, esses organismos podem sofrer esmagamento, além do risco de desalojamento pela ação das ondas, que podem levá-los a locais inadequadas para a sobrevivência (TAIT & DIPPER, 1998).

Os habitantes da zona entre marés também estão sujeitos à variações amplas e rápidas de temperatura que ocorrem durante a maré baixa decorrentes, por exemplo, da radiação solar. Ao mesmo tempo, estão sujeitos à variação de salinidade resultante da diluição da água local pela chuva, ou em decorrência da evaporação, que é capaz de deixar a água concentrada. Devido à fotossíntese e atividade bacteriana, pode haver flutuações nos níveis de oxigênio, dióxido de carbono e pH. Outro fator importante é a exposição dos organismos da zona entre marés a predadores tanto no período de maré alta, quando ficam vulneráveis à predação por organismos marinhos, quanto no período de maré baixa, quando são predados por organismos terrestres (TAIT & DIPPER, 1998).

A obtenção de alimento na zona entre marés pode se tornar mais uma dificuldade para a colonização da área. Os organismos raspadores habitantes dessa região são supridos pelo biofilme formado na superfície das rochas. No entanto, os filtradores e comedores de depósito são diretamente dependentes do ciclo das marés para obter alimentos, sendo supridos somente nos períodos de maré alta (PECK *et al.*, 2006).

Somado a todas as restrições naturais impostas pela zona entre marés, a poluição é um fator limitante adicional à vida nessa região. A vulnerabilidade da zona entre marés é evidenciada em especial devido ao grande impacto que poluentes são capazes de causar nessa região, já que direta ou indiretamente, os contaminantes acabam sendo levados para a costa (BUSTAMANTE *et al.*, 2010).

A zona entre marés antártica, além de apresentar os desafios inerentes do local, como os citados anteriormente, oferece desafios adicionais para a sustentação da vida. A presença de gelo, que é lançado contra a região costeira pela ação das ondas; o aporte de água de degelo proveniente do derretimento de geleiras que, além de diminuir a salinidade, também traz metais pesados e outros contaminantes presentes no solo; o congelamento do mar durante o inverno, que cobre a região costeira e a torna disponível somente em períodos sem gelo; a ação da alta radiação UV durante os períodos de emersão (ZACHER *et al.*, 2007); e a ação antrópica são fatores seletivos adicionais que agem sobre a biota local.

Durante o verão antártico, no período de maré alta, a temperatura da água geralmente varia entre $-0,5^{\circ}\text{C}$ e $+1,5^{\circ}\text{C}$ (PECK *et al.*, 2006), no entanto, durante a maré baixa, a temperatura nas poças de maré podem variar de 0°C a 9°C (ABELE *et al.*, 1999). No inverno, a variação da temperatura do mar pode ser alta também, sendo capaz de alcançar valores extremamente baixos como -20°C . Em termos de temperatura, os intervalos térmicos experimentados na zona litorânea podem estar mais próximo do ambiente terrestre do que do ambiente marinho, particularmente no verão (PECK *et al.*, 2006).

Apesar do litoral antártico ser considerado intocado, o habitat marinho bentônico raso que se encontra adjacente às estações científicas, em funcionamento ou abandonadas, é geralmente poluído (NEGRI *et al.*, 2006). Até os anos 1980, não havia um padrão de manejo de esgoto, que era realizado de forma descontrolada (RUNCIE & RIDDLE, 2004), o que levou à implementação de um rígido Protocolo de Proteção Ambiental, com o intuito de prevenir a poluição (SANTOS *et al.*, 2005). Todavia, a contaminação da Antártica é proveniente não só das estações científicas, mas também de navios de pesca e turismo, e de partículas

suspensas no ar que são transportadas de outros continentes e chegam à Antártica por rotas atmosféricas (BARGAGLI, 2008).

Nesse contexto, vários estudos já foram realizados para verificar a contaminação do solo na Antártica em regiões com intensa atividade humana, bem como a bioacumulação e os impactos desses poluentes sobre a biota marinha local (DUQUESNE *et al.*, 2000; SNAPE *et al.*, 2001; MARTINS *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2005; NEGRI *et al.*, 2006), que é diretamente atingida pelos contaminantes que são levados para o mar pela ação da água de degelo, atingindo inicialmente a zona entre marés, tornando-a vulnerável à ação dessas substâncias.

Entretanto, alguns estudos mostram que os níveis elevados de metais pesados encontrados no ambiente marinho antártico abiótico e biótico são originários não da contaminação humana, mas sim de eventos naturais relacionados com a origem vulcânica da Península Antártica e Ilhas adjacentes. As concentrações elevadas de cobre ($68-88 \mu\text{g g}^{-1}$) encontradas no sedimento marinho costeiro de Collins Harbour - Baía de Maxwell, Ilha Rei George, Antártica, foram consideradas tão elevadas quanto as encontradas nos ambientes marinhos mais poluídos do planeta. Contudo, nesse caso, os altos níveis de cobre no sedimento marinho estão relacionados com a erosão de rochas vulcânicas pela água de degelo, que transportam o cobre para o mar (AHN *et al.*, 1996).

Deheyn e colaboradores (2005) encontraram concentrações elevadas de Fe, Mn e Zn na fauna marinha da Ilha Deception, que é um vulcão ativo onde o sedimento marinho e a água do mar contêm concentrações elevadas de metais. Como esses elementos são abundantes em regiões com atividade geotérmica, a bioacumulação na fauna local revelou a biodisponibilidade dos mesmos para os organismos. Ahn *et al.* (2004) verificaram que as altas concentrações de metais como Cd, Cu, Al, entre outros, encontrados nos tecidos de *Nacella concinna*, um gastrópode da zona entre marés da Antártica, eram de origem litogênica, e não antropogênica, e que esses metais eram biomagnificados na cadeia alimentar.

Apesar de ser um ambiente desafiador e vulnerável à ação humana, a zona entre marés na Antártica tem uma grande importância ecológica, pois apesar de ser constituído basicamente por cascalhos, matacões e seixos e ter uma fauna pobre, serve de substrato para diatomáceas e macroalgas filamentosas, além de ser uma fonte de alimento para herbívoros marinhos de águas rasas quando microfitobentos são levados das rochas da zona entre marés para as regiões rasas próximas pela ação das ondas (AHN *et al.*, 1997; AHN *et al.*, 2002). Geralmente, a fauna habitante da zona entre marés antártica é vágil, para diminuir os estresses da vida nessa

região, e é constituída por gastrópodes, poliquetas, anfípodas e priapulidas. No entanto, formas de vida sésseis como briozoários, embora escassamente presentes, também podem ser observados na zona entre marés da Antártica (BARNES *et al.*, 1996).

1.5. *Nacella concinna* (Strebel, 1908)

O patelídeo antártico *Nacella concinna* (FIGURA 3) é comum ao redor da Península Antártica e em vários grupos de ilhas subantárticas (DAVENPORT, 2001), sendo o gastrópode mais conspícuo e usualmente o único macroinvertebrado encontrado nas zonas entre marés impactadas por gelo e fisicamente instáveis (AHN *et al.*, 2002). *N. concinna* também ocorre no infralitoral em profundidade de até 110 metros, mas sua distribuição principal é em lugares rasos (CADÉE, 1999).



FIGURA 3. GASTRÓPODE *Nacella concinna* ADERIDO ÀS ROCHAS DA ZONA ENTRE MARÉS DURANTE A MARÉ BAIXA EM PUNTA PLAZA, BAÍA DO ALMIRANTADO, ILHA REI GEORGE, ARQUIPÉLAGO DAS SHETLANDS DO SUL, ANTÁRTICA. FONTE: O AUTOR (2011).

Uma das características dessa espécie é a existência de dois morfotipos distintos de *N. concinna* no ambiente marinho antártico (WALKER, 1972). O morfotipo habitante do sublitoral não migra para a zona entre marés, e se mantém submerso durante todo o ano. Já o morfotipo encontrado na zona entre marés reside na faixa litorânea durante o verão e migra para o sublitoral raso no início do outono, como uma resposta à redução de temperatura e congelamento da região litorânea durante o inverno (DE ARANZAMENDI *et al.*, 2010). No entanto, há relatos da presença de *N. concinna* na zona entre marés abaixo do gelo durante o inverno (WALLER *et al.*, 2006; OBERMÜLLER *et al.*, 2011).

As diferenças entre os morfotipos de *N. concinna* não se resumem à capacidade migratória. Morfologicamente, existem diferenças nas conchas (FIGURA

4), que são achatadas, largas e com o ápice bem definido nos indivíduos do sublitoral, enquanto nos animais da zona entre marés, as conchas são mais altas e globosas, e o ápice pode às vezes, se encontrar deslocado para a região anterior (WALKER, 1972; DE ARANZAMENDI *et al.*, 2010). Os morfotipos de *N. concinna* também apresentam diferenças fisiológicas. Weihe *et al.* (2010) e Weihe & Abele (2008) verificaram que os animais do sublitoral apresentam respostas metabólicas anaeróbicas quando expostos ao ar, enquanto os da zona entre marés apresentam uma resposta metabólica aeróbia.



FIGURA 4. DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS DAS CONCHAS DE *Nacella concinna* DO INFRALITORAL (ESQUERDA) E DA ZONA ENTRE MARÉS (DIREITA).
FONTE: ADAPTADO DE WEIHE (2009).

Weihe *et al.* (2010), também verificaram que os animais da zona entre marés são capazes de sub-regular o metabolismo na glândula digestiva e brânquias, incluindo a síntese de antioxidantes, durante a exposição ao ar ou à hipóxia como forma de economizar energia. Já os espécimes do sublitoral, durante a exposição ao ar ou à hipóxia, aumentam a atividade de superóxido dismutase, indicando uma resposta ao estresse por indução de proteção antioxidante enzimática a fim de manter o potencial redox baixo; os níveis de glutathione diminuem, e as brânquias se tornam transientemente acidificadas e oxidadas durante o período de exposição aérea, indicando que os espécimes do sublitoral apresentam maiores problemas para manter a homeostase quando expostos à dessecação.

Apesar de serem evidentes as diferenças morfológicas e fisiológicas existentes entre os morfotipos de *N. concinna*, acredita-se que não existem diferenças genéticas entre eles. Embora De Aranzamendi *et al.* (2008) tenham relatado diferenças genéticas entre as populações de *N. concinna* do sublitoral e da zona entre marés, essas não ficaram evidentes nos estudos de Chwedorzewska *et al.* (2010) e Hoffman *et al.* (2010). Tanto Hoffman *et al.* (2010) quanto

Chwedorzewska *et al.* (2010) sugeriram que talvez esse resultado divergente encontrado por De Aranzamendi *et al.* (2008) esteja relacionado com as diferenças metodológicas, que vão desde os marcadores genéticos utilizados até o baixo número de animais analisados.

As condições ambientais extremas da zona entre marés da Antártica impõem desafios à sustentação da vida. Os organismos lidam diariamente com flutuações de temperatura e salinidade, impacto de ondas e gelo, predação e exposição à radiação UV que, devido ao “buraco” na camada de ozônio, incide de forma mais intensa na Antártica (WEATHERHEAD & ANDERSEN, 2006; ZACHER *et al.*, 2007).

Por outro lado, as condições adversas da zona entre marés acabam sendo vantajosas para os organismos que conseguem lidar com as restrições desse ambiente. Assim, uma forte seleção natural permitiu que poucos organismos conseguissem habitar essa região. A grande disponibilidade de alimento na zona entre marés durante o verão antártico, parece ser um dos fatores determinantes da migração de *N. concinna* do sublitoral para a zona entre marés, reduzindo a competição intraespecífica presente no sublitoral (BRETHES *et al.*, 1994; CHOY *et al.*, 2011).

Vários estudos já foram realizados a fim de entender como o gastrópode *N. concinna* responde às flutuações diárias das condições ambientais da zona entre marés. Abele *et al.* (1998) analisaram o efeito do estresse oxidativo e a resposta anti-oxidante de *N. concinna* frente à variação de temperatura e a exposição à H₂O₂, simulando as condições vivenciadas por esses animais no seu habitat, e concluíram que esse molusco é capaz de suportar essas condições intensificando suas defesas anti-oxidantes, mediante a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase na brânquia e glândula digestiva, além da sua capacidade de elevar o pH intracelular de 7,21 no controle (0°C) para 7,36 a 9°C, o que por si só, aumenta a atividade da superóxido dismutase em aproximadamente 10%. Os estudos sobre estresse térmico, também revelaram que a janela de tolerância térmica desse gastrópode chega aos +9,0°C, quando então o consumo de oxigênio declina acentuadamente (PÖRTNER *et al.*, 1999).

Outro fator que permite a sobrevivência de *N. concinna* nos períodos de emersão é a capacidade desses animais, assim como outros moluscos habitantes da zona entre marés, de reduzir o metabolismo, além de aproximar a concha do substrato para diminuir a perda de água (ORTMANN & GRIESHABER, 2003; MALANGA *et al.*, 2005). No entanto, *N. concinna* não é capaz de promover uma selagem eficaz entre a concha e o substrato, como os gastrópodes de regiões

temperadas, o que torna esse molusco mais suscetível ao contato com água doce que chega à zona entre marés. Como é um animal osmoconformista estenoalino, que apresenta 50% de mortalidade após exposição de 96 horas à 20,9 psu, *N. concinna* apresenta algumas características comportamentais que minimizam a exposição da água doce que chega à zona entre marés (DAVENPORT, 2001).

Em poças grandes, esses moluscos costumam se concentrar no fundo da poça, o que diminui a exposição à baixa salinidade devido à estratificação da água. Já em superfícies verticais, o gastrópode responde à presença de água doce se soltando do substrato, para se realocar em substratos menos expostos às águas de degelo. Essas duas estratégias nem sempre garantem a sobrevivência de *N. concinna*. Por outro lado, a elevada capacidade de recuperação da osmolalidade da hemolínfa e do volume corpóreo, após exposição à água doce, representa um mecanismo mais eficaz de sobrevivência às baixas salinidades (DAVENPORT, 2001).

Os animais habitantes da zona entre marés têm que lidar não somente com os desafios naturais, mas também com a ação antrópica. O infralitoral próximo à praia e a zona entre marés da Antártica são particularmente vulneráveis aos contaminantes orgânicos (ANSALDO *et al.*, 2005). Análises realizadas por Curtosi e colaboradores (2009) sobre a concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na glândula digestiva, gônadas e tecido muscular do bivalve filtrador *Laternula elliptica*, coletadas em áreas com intensa atividade de embarcações, e do gastrópode raspador *N. concinna*, coletados na zona entre marés de locais distantes da ação antrópica, revelaram que os níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) não apresentaram relação com os locais de coleta. Nesse caso, os autores concluíram que a falta de um padrão distintivo no conteúdo de HPAs entre as duas espécies poderia estar relacionado ao fato de a zona entre marés estar exposta aos efeitos diretos dos resíduos de combustíveis flutuantes na camada superficial durante a maré baixa e, conseqüentemente, os gastrópodes podem estar em contato direto com resíduos de óleo.

O gastrópode *N. concinna* possui desenvolvimento indireto, com estágio larval véliger planctônico livre-natante que é capaz de sobreviver na coluna d'água por até dois meses (BOWDEN *et al.*, 2006; HOFFMAN *et al.*, 2011). No período reprodutivo, esse molusco apresenta desova em massa e sincronizada, que ocorre uma vez ao ano entre novembro e fevereiro (primavera/verão austral) (PICKEN, 1980; PICKEN & ALLAN, 1983; BRETHES *et al.*, 1994; KIM, 2001), o que coincide com o período de maior atividade antrópica na Antártica.

A principal fonte de contaminação por hidrocarbonetos na Antártica são os vazamentos de óleo diesel de embarcações e estações científicas (KENNICUTT II *et al.*, 1992a). Nos últimos anos, foram reportados diversos acidentes envolvendo vazamentos de óleo diesel, tanto no ambiente terrestre quanto no ambiente marinho antártico (KENNICUTT, 1990; CRIPPS, 1992; CRIPPS & SHEARS, 1997; GORE *et al.*, 1999; AISLABIE *et al.*, 2004; CURTOSI *et al.*, 2009). A contaminação do solo é geralmente pontual, mas hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) podem ser transportados pelas águas de degelo para o sedimento marinho (KENNICUTT II *et al.*, 1992a; AISLABIE *et al.*, 1999).

A presença humana na Antártica, principalmente durante o verão austral, aumenta substancialmente o risco de vazamentos de óleo diesel, podendo comprometer tanto a desova quanto o desenvolvimento larval de *N. concinna*, impactando a reprodução e desenvolvimento desse gastrópode. A exposição de larvas de peixes e moluscos aos HPAs pode causar deformidades, afetar o crescimento e desenvolvimento, além de aumentar a mortalidade (STROMGREN & NIELSEN, 1991; HOFFMAN *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2010; INGVARSDÓTTIR *et al.*, 2012).

No naufrágio do quebra gelo *Bahia Paraíso*, análises de hidrocarboneto confirmaram a contaminação de macroalgas, *N. concinna* e do sedimento marinho com diesel, sendo que as concentrações mais elevadas foram encontradas em organismos e sedimentos da zona entre marés, em locais que se encontravam à favor do vento no momento do acidente (KENNICUTT, 1990).

Os impactos decorrentes da contaminação por óleo não se resumem às comunidades da zona entre marés, mas também às comunidades localizadas no segmento superior da cadeia alimentar. Concentrações de HPAs, entre 15 e 2932 ppb de peso seco, foram encontradas em *N. concinna* coletados em locais próximos à estação Palmer. Os níveis mais elevados de contaminantes foram detectados em organismos da zona entre marés, próximo aos pontos de embarque e desembarque, frequentados por pequenas embarcações utilizadas para o transporte de pessoal e no apoio logístico de abastecimento da estação científica (KENNICUTT, 1990).

N. concinna participa da transferência de energia entre os ambientes marinho e terrestre, atuando como mediador trófico entre produtores primários e predadores de topo da cadeia alimentar antártica (CHOY *et al.*, 2011). Esse gastrópode é predado por aves e é um importante item da alimentação da gaivota *Larus dominicanus* (KIM, 2001). O acúmulo de HPAs nos tecidos de *N. concinna* expõem predadores de topo aos efeitos nocivos desses hidrocarbonetos. Os

constituintes do óleo diesel podem comprometer a reprodução e o crescimento de aves, promovendo alterações endócrinas e comportamentais, bem como desordens sanguíneas que aumentam a propensão à doenças e podem prejudicar o desenvolvimento (SAMIULLAH, 1985; EPPLEY, 1992; TSENG, 1999; HOFFMAN *et al.*, 2001; ALONSO-ALVAREZ *et al.*, 2007).

Os efeitos de óleo diesel sobre o metabolismo de *N. concinna* têm sido pouco estudados. Ansaldo e colaboradores (2005; 2010), procuraram entender os efeitos desse óleo combustível sobre a defesa antioxidante da glândula digestiva de *N. concinna*, mas não avaliaram as possíveis interações entre o diesel e as variações de salinidade e temperatura vivenciadas por *N. concinna* em seu ambiente natural. Os autores também não estudaram os efeitos de óleo diesel sobre o metabolismo de outros tecidos, bem como sobre os níveis de enzimas do metabolismo energético e argininolítico. Nesse contexto, o presente estudo tem como proposta avaliar o efeito do óleo diesel isoladamente e associado à variações termo-salinas nos metabolismos energético, argininolítico e defesa antioxidante de *N. concinna*.

A escolha de *N. concinna* levou em consideração a sua ampla distribuição na zona entre marés da ASMA da Baía do Almirantado, bem como os estudos de poluição ambiental com metais pesados (AHN *et al.*, 2004; AHN, 2005) e óleo diesel (KENNICUTT II *et al.*, 1992b; ANSALDO *et al.*, 2005), realizados com esse gastrópode.

Os ciclos de marés expõe periodicamente o gastrópode *N. concinna* às baixas salinidades das águas de degelo e às temperaturas mais elevadas do ambiente terrestre durante o verão. Essas variações atuam como fatores estressores e podem alterar as respostas fisiológicas desse molusco. Assim, os estudos com óleo diesel foram conduzidos em quatro condições termo-salinas, combinando duas salinidades (35 e 25 psu) e duas temperaturas (0 e 4°C).

A glândula digestiva foi analisada considerando o seu potencial bioacumulador de metais e hidrocarbonetos, além da sua capacidade de detoxificação de xenobióticos. A escolha das brânquias considerou o seu papel central nas trocas gasosas e por estar em contato direto com os contaminantes presentes na água. O pé muscular foi analisado considerando as demandas energéticas desse tecido em relação ao trabalho muscular de adesão, deslocamento e captação de oxigênio desse gastrópode durante o período de emersão da zona entre marés (WEIHE *et al.*, 2010).

O metabolismo de carboidratos é essencial para sobrevivência de todos os organismos e tem a glicose como um composto de importância central (DIENI & STOREY, 2011). O metabolismo energético e suas vias geradoras de ATP utilizam carboidratos, lipídeos e proteínas como substratos, e são a base de todos os sistemas fisiológicos, pois sustentam as demandas energéticas de sistemas como o locomotor, digestório, reprodutor, dentre outros (CLARKE, 2003). As hexoquinases (HKs) catalisam a primeira etapa de reação da via glicolítica e introduzem a glicose no metabolismo celular (GONZÁLEZ-ALVAREZ *et al.*, 2009). A fosfofrutoquinase (PFK) catalisa a fosforilação da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bisfosfato e tem sido considerada uma das principais enzimas reguladoras da via glicolítica (SIMPFENDÖRFER *et al.*, 2006). A lactato desidrogenase (LDH) catalisa a reação terminal da glicólise, reduzindo o ácido pirúvico em ácido láctico, sendo considerada marcadora do potencial anaeróbio gerador de ATP (TORRES & SOMERO, 1988a). Citrato sintase (CS) e malato desidrogenase (MDH) são enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e tem sido utilizadas como marcadoras do potencial aeróbio gerador de ATP dos tecidos (TORRES & SOMERO, 1988b; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Considerando a complexidade do metabolismo energético e o papel central dos mecanismos geradores de ATP como base dos demais sistemas fisiológicos, diversos autores têm utilizados os níveis teciduais de enzimas da via glicolítica e ciclo dos ácidos tricarboxílicos como marcadores do potencial gerador de ATP (CLARKE, 2003). Dessa forma, no presente estudo, as atividades específicas das enzimas HK, marcadora do potencial ativador de glicose nos tecidos; PFK, principal enzima reguladora da via glicolítica; LDH, enzima terminal da glicólise e marcadora do potencial anaeróbio; CS e MDH, marcadoras do potencial aeróbio dos tecidos, foram determinadas nos tecidos branquial e muscular de *N. concinna* (FIGURA 5).

A atividade específica da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi determinada considerando o papel chave dessa enzima como principal reguladora da via das pentoses e diretamente com a manutenção do potencial redutor de $\text{NADH} + \text{H}^+$, utilizado como agente redutor de diversos processos metabólicos, incluindo a defesa antioxidante dos tecidos. O estresse causado por poluentes, muitas vezes aceleram a formação de espécies reativas de oxigênio e podem causar danos irreversíveis e severos às células. As atividades das enzimas glutathiona redutase (GR), que reduz a glutathiona oxidada (GSSG) em reduzida (GSH); glutathiona S-transferase (GST), que catalisa a detoxificação de espécies reativas de oxigênio; a superóxido dismutase (SOD) que dismuta os ânions superóxidos (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2); a catalase (CAT) que decompõe a água oxigenada; foram determinadas como potencial marcadoras do

estresse oxidativo (VAN DER OOST *et al.*, 2003; ANSALDO *et al.*, 2005). Os efeitos deletérios do estresse oxidativo sobre estruturas moleculares foram avaliadas determinando os níveis teciduais de peroxidação lipídica (LPO) e carbonilação proteica (PCO) (ANSALDO *et al.*, 2005).

Fosfágenos são típicos de tecidos nos quais existe uma grande e variável demanda energética (ELLINGTON, 2001). A função celular primária desses compostos reside no estoque de fosfatos de alta energia ligados a produção de ATP, participando da manutenção dos níveis de ATP durante as flutuações de demanda energética dos tecidos (KINSEY *et al.*, 2007). Diversos tipos de fosfágenos podem ser encontrados nos tecidos de invertebrados, como a fosfo-L-arginina formada a partir da fosforilação do aminoácido L-arginina (HIRD, 1986; RODRIGUES *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2009).

O metabolismo da fosfo-L-arginina no pé muscular de *N. concinna* é de fundamental importância na recuperação do estresse térmico, mediante redução dos níveis de L-arginina. Como a remoção desse aminoácido não foi devido a formação de octopamina, o catabolismo da L-arginina foi apontado como sendo a provável via de remoção (PÖRTNER *et al.*, 1999). A arginase (ARG) apresenta ampla distribuição na natureza, atua como enzima terminal do ciclo da uréia em animais ureotélicos e controla os níveis de L-arginina em tecidos não ureogênicos (JENKINSON *et al.*, 1996). A presença de níveis relativamente elevados de arginase nas brânquias e pé muscular de *N. concinna* corroboram com a sua possível participação no catabolismo da L-arginina (RODRIGUES *et al.*, 2011). Assim, os níveis de ARG nas brânquias e pé muscular foram utilizados como marcadores do potencial argininolítico desses tecidos na contaminação por óleo diesel.

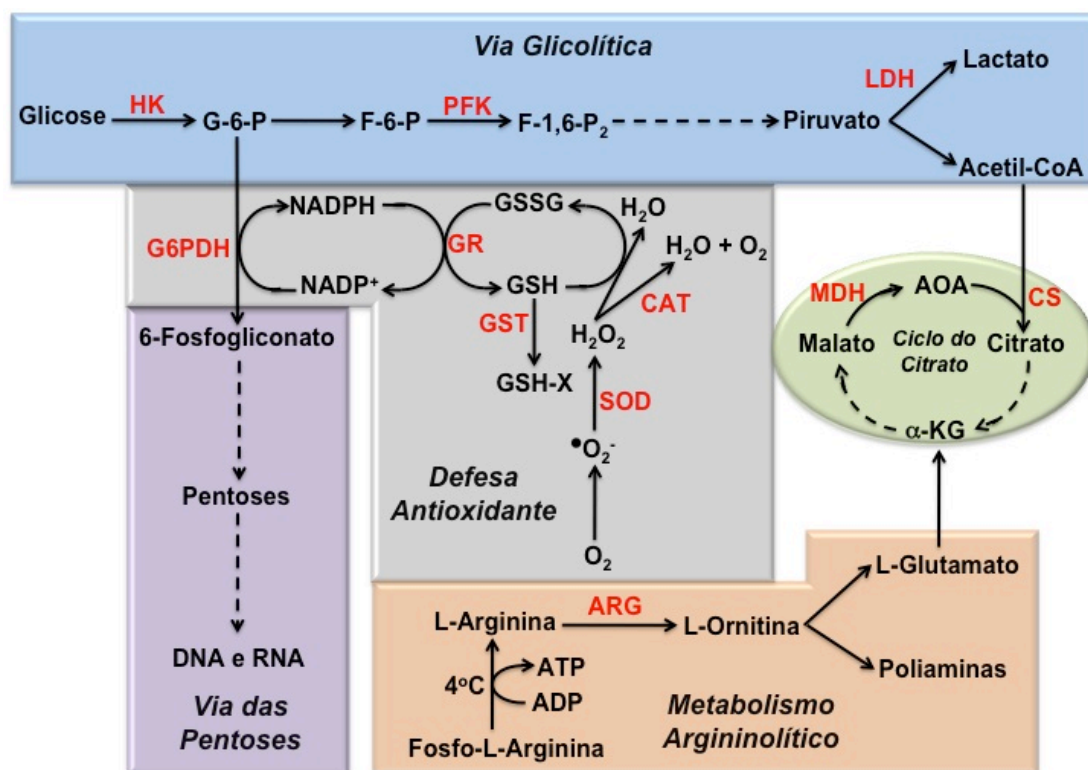


FIGURA 5. ESQUEMATIZAÇÃO DAS VIAS METABÓLICAS COM AS REAÇÕES CATALISADAS PELAS ENZIMAS ANALISADAS NO PRESENTE ESTUDO. EM AZUL: VIA GLICOLÍTICA; EM ROXO: VIA DAS PENTOSSES; EM CINZA: DEFESA ANTIOXIDANTE; EM VERDE: CICLO DOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS; EM LARANJA: METABOLISMO ARGININOLÍTICO. SETAS PONTILHADAS INDICAM A PRESENÇA DE REAÇÕES OMITIDAS NO ESQUEMA. HK: HEXOQUINASE; PFK: FOSFOFRUTOQUINASE; LDH: LACTATO DESIDROGENASE; CS: CITRATO SINTASE; MDH: MALATO DESIDROGENASE; G6PDH: GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE; GR: GLUTATIONA REDUTASE; GST: GLUTATIONA S-TRANSFERASE; SOD: SUPERÓXIDO DISMUTASE; CAT: CATALASE; ARG: ARGINASE; A-KG: A-CETOGLUTARATO; AOA: OXALOACETATO.

FONTE: O AUTOR (2013)

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo avaliar experimentalmente a resposta metabólica do gastrópode *Nacella concinna*, exposto ao óleo diesel em duas condições de salinidade (35 e 25 psu) e temperatura (0 e 4°C).

Especificamente, foi avaliado o estresse causado pelo óleo diesel sobre o metabolismo energético, argininolítico e defesa antioxidante nos tecidos branquial, muscular e glândula digestiva de *N. concinna*.

Nas brânquias e pé muscular, foram analisadas as enzimas: hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), lactato desidrogenase (LDH), malato desidrogenase (MDH) e citrato sintase (CS), do metabolismo energético; glutathione redutase (GR), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), da defesa antioxidante; bem como a arginase (ARG) do metabolismo argininolítico. A massa reduzida de tecido branquial inviabilizou a determinação dos níveis de peroxidação lipídica (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO).

Na glândula digestiva, foram analisadas as enzimas: glutathione redutase (GR), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), da defesa antioxidante, bem como os marcadores de lesão oxidativa peroxidação lipídica (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO).

3. JUSTIFICATIVA

O presente estudo integra as atividades de pesquisa do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais (INCT-APA), que desenvolve pesquisa em monitoramento na Área Antártica Especialmente Gerenciada (ASMA#01) da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Shetlands do Sul.

Essa região abriga instalações científicas de cinco países e recebe a visita de navios científicos e de turismo. A presença humana na região e a transferência de óleo combustível dos navios para as estações científicas litorâneas têm proporcionado contaminação do solo e do ambiente marinho. Durante o inverno de 1986, vazaram 36.000 L de óleo diesel da Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz (EACF) e, nos anos subsequentes, ocorreram pequenos vazamentos. A contaminação do solo no entorno da EACF é visível e o óleo diesel derramado vem sendo arrastado pelas águas de degelo e percola na zona entre marés (FIGURA 6).

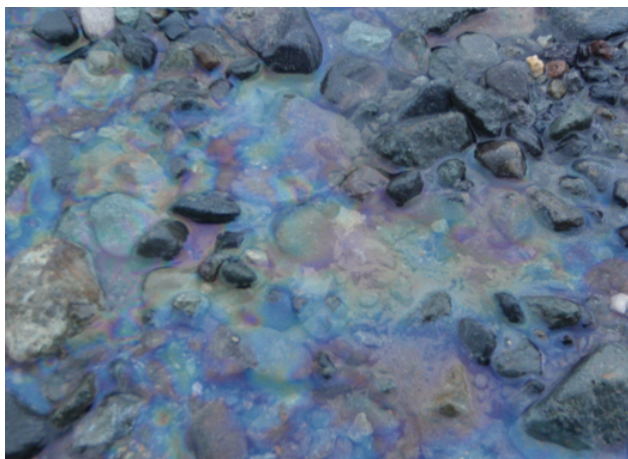


FIGURA 6. SOLO NO ENTORNO DOS RESERVATÓRIOS DE ÓLEO DIESEL DA ESTAÇÃO ANTÁRTICA COMANDANTE FERRAZ. PODE-SE OBSERVAR O DIESEL SOBRE A ÁGUA DE DEGELO QUE ESCORRE PELO SOLO E CHEGA À ZONA ENTRE MARÉS NOS ARREDORES DA EACF.
FONTE: ÉDSON RODRIGUES JÚNIOR (2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Recursos e Apoio Logístico

A presente proposta recebeu o apoio do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Comissão Interministerial para os recursos do Mar (CIRM), do Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) e da Marinha do Brasil. O presente estudo integra as atividades de pesquisa científica da Área Temática 3 do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisa Ambiental (INCT-APA) sob o nº CNPq. 57.4018/2008-5 e FAPERJ nº E-26/170.023/2008.

4.2. Material Biológico

Os exemplares de *Nacella concinna* (FIGURA 7) foram coletados entre janeiro e março de 2011, em Punta Plaza, na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península de Keller, Antártica (FIGURA 8). O local de coleta foi escolhido considerando o baixo impacto de fontes poluidoras. Animais medindo entre 30-40 mm (comprimento da concha) foram removidos manualmente de rochas da zona entre marés, de forma aleatória, durante o período de maré baixa e imediatamente transportados para EACF, em recipiente contendo água do mar.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em aquários e mantidos sob condições controladas de temperatura (0°C), salinidade (35 psu) e aeração durante três dias, quando então os bioensaios foram iniciados. A licença ambiental para coleta e experimentação de *N. concinna* foi emitida pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) e Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o nº 496.



FIGURA 7. VISTA DORSAL (ESQUERDA) E VENTRAL (DIREITA) DE *Nacella concinna*. FONTE: O AUTOR (2011).

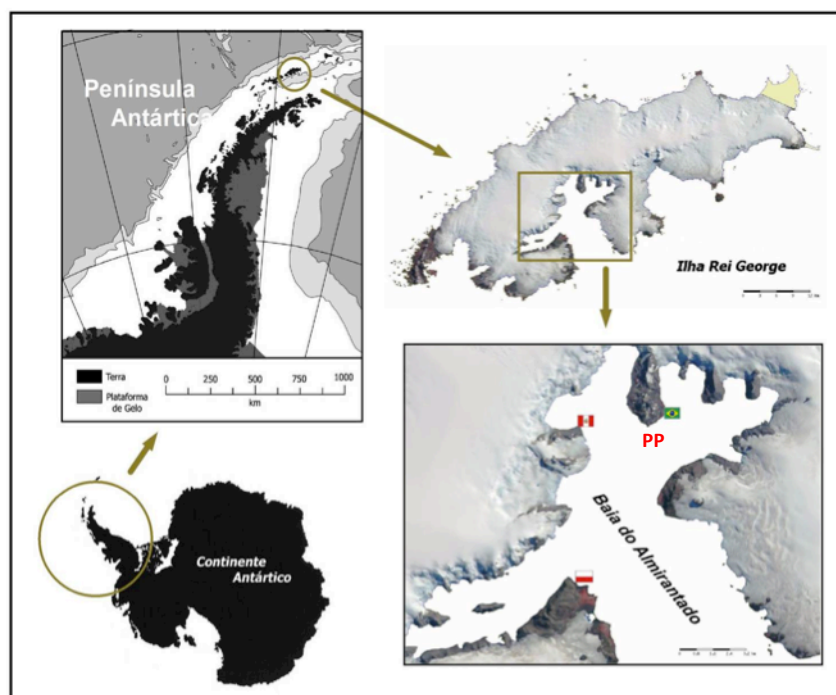


FIGURA 8. MAPA ESQUEMÁTICO DA PENÍNSULA ANTÁRTICA, ILHA REI GEORGE E BAÍA DO ALMIRANTADO, COM A LOCALIZAÇÃO DA EACF (BANDEIRA BRASILEIRA) E DE PUNTA PLAZA (PP) ONDE FOI FEITA A COLETA DE ESPÉCIMES DE *Nacella concinna* UTILIZADOS NO PRESENTE ESTUDO.

FONTE: ADAPTADO DE CLARKE (2007).

4.3. Protocolo Experimental

Os experimentos foram conduzidos no período de janeiro a março de 2011, em 12 aquários plásticos de 26,2 x 17,7 x 14,7 cm (comprimento x largura x altura), sob temperatura controlada por banho-maria circulante ultratermostatizado (FIGURA 9). Cada aquário recebeu 10 patelídeos aleatoriamente e foram mantidos durante três dias em condição termo-salina próxima do ambiente marinho do infralitoral (0°C, 35psu).

Os bioensaios foram conduzidos simultaneamente em 4 condições termo-salinas distintas, sendo: a) 0°C-35 psu; b) 0°C-25 psu; c) 4°C-35 psu; e d) 4°C-25 psu (FIGURA 10). Em cada condição, um dos aquários foi mantido sem diesel (controle); outro com óleo 1% (v/v) e o último com diesel 5% (v/v). A escolha das concentrações de óleo diesel levou em consideração o histórico de exposição de *N. concinna* aos grandes volumes de óleo combustível vazados em acidentes, como o naufrágio do quebra gelo *Bahia Paraíso* em 1989, no qual vazaram 600.000 L de diesel, bem como o vazamento de 36.000 L de diesel dos reservatórios de combustível da EACF em 1986. O início dos experimentos foi marcado pelo sifonamento dos aquários e subsequente adição de água do mar pré ajustada nas condições termo-salinas experimentais. A troca d'água dos aquários para condição hipossalina (25 psu) foi realizada lentamente ao longo de 4 h, diluindo-se a água do

mar a 35 psu com água doce (água de degelo). O óleo diesel utilizado nos experimentos foi coletado nos tanques de combustível da EACF com autorização do PROANTAR.

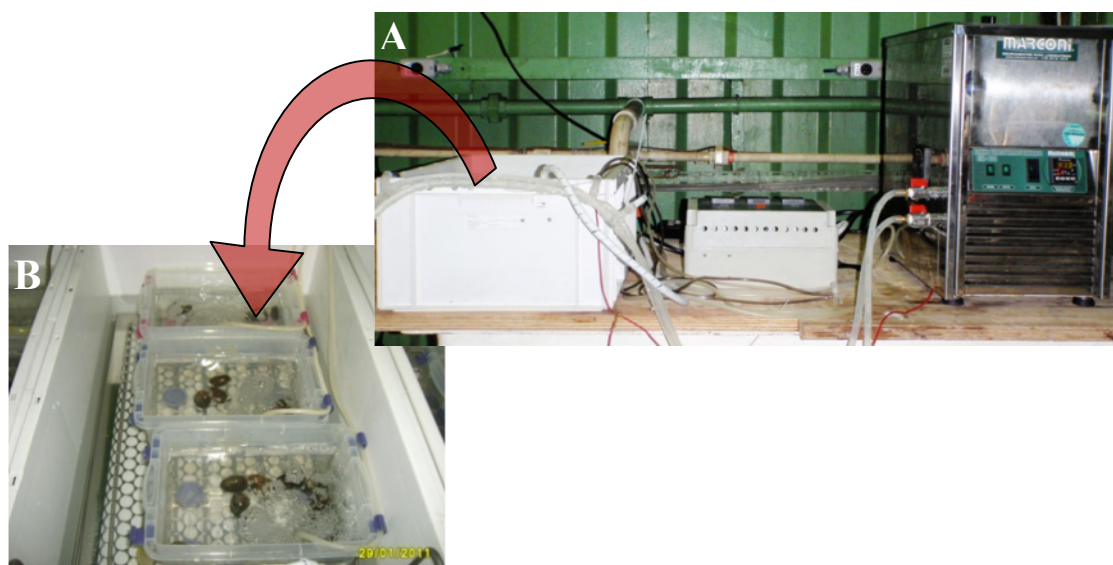


FIGURA 9. BANHO-MARIA ULTRATERMOSTATIZADO. VISTA GERAL DO BANHO-MARIA REFRIGERADO (A); VISTA DOS AQUÁRIOS COM ESPÉCIMES DE *Nacella concinna* ONDE OS EXPERIMENTOS FORAM CONDUZIDOS (B).
FONTE: O AUTOR (2011).

A troca de água e do óleo diesel foi diária e realizada mediante sifonamento dos aquários, seguida da imediata recomposição da condição experimental. Nos aquários controle, a água também foi trocada integralmente todos os dias, porém não foi acrescentado o diesel. Para verificar se os animais permaneciam vivos, o pé muscular dos espécimes foi mecanicamente estimulado com a ponta dos dedos no momento da troca de água. Durante a manutenção e mesmo ao término dos bioensaios, toda água contaminada com óleo diesel foi dispensada em local destinado ao descarte de resíduos de óleo da EACF e transportada ao Brasil via navios da marinha do Brasil. Não foi oferecida alimentação para os animais no decorrer de todo o experimento, e o fotoperíodo foi de 12h.

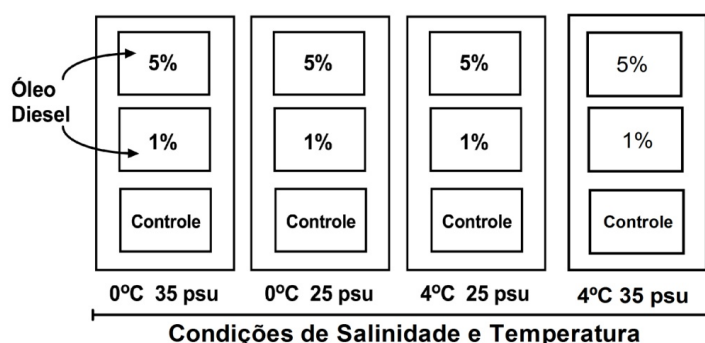


FIGURA 10. MODELO ESQUEMÁTICO DOS AQUÁRIOS INSERIDOS NOS BANHOS-MARIAS REFRIGERADOS, DEMONSTRANDO OS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM *Nacella concinna*.

FONTE: EDSON RODRIGUES (2011).

No oitavo dia de experimento, foi constatada a morte de alguns animais, e o período experimental inicialmente previsto em dez dias, foi abreviado para oito dias, com o objetivo de obter um número aceitável de animais para as análises bioquímicas. Dessa forma, os espécimes foram mantidos em condição experimental durante oito dias e, no nono dia, foram dissecados. Brânquias, pé muscular e glândula digestiva foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e transportados para o Laboratório de Bioquímica da Universidade de Taubaté, onde as análises foram realizadas.

Além dos animais utilizados nos bioensaios, também foram coletados oito espécimes de *N. concinna*, no mesmo ponto de coleta, Punta Plaza, e utilizados como grupo referência da natureza. Os animais foram imediatamente dissecados e os tecidos congelados em nitrogênio líquido.

Os experimentos com óleo diesel foram conduzidos em quatro condições termo-salinas distintas e, para cada uma delas, um grupo controle sem diesel. O controle 0-35 foi assumido como sendo a condição experimental mais próxima do ambiente marinho da zona entre marés, durante o seu período de imersão. Assim, os níveis teciduais de enzimas da defesa antioxidante, metabolismo energético e nitrogenado, bem como os marcadores de lesão oxidativa (LPO e PCO) do grupo controle experimental 0-35 foram comparados com o grupo referência da natureza, que sofre o impacto de vários fatores ambientais, em especial aqueles inerentes ao ciclo de marés

4.4. Análises Bioquímicas

4.4.1. Homogeneizados livres de células

Os homogeneizados foram preparados na proporção de 10 mL de Tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) para 1g de brânquias e 5mL de Tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) para 1 g de pé muscular e glândula digestiva. As amostras foram homogeneizadas em Potter-Elvehjen e as estruturas subcelulares rompidas com ultrassom. Os homogeneizados foram centrifugados a 14.000 x g durante 10 minutos à 4°C, os sobrenadantes alíquotados e utilizados para as análises bioquímicas.

Os ácidos nucleicos podem interferir na dosagem de proteínas carboniladas, proporcionando valores incorretamente mais elevados de carbonil. Dessa forma, para a determinação de proteínas carboniladas, parte dos homogeneizados das glândulas digestivas foram tratados com estreptomicina para eliminação dos ácidos nucleicos, como descrito por Reznick & Packer (1994). Nesse caso, foi adicionado

sulfato de estreptomicina dissolvido em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,2), para concentração final de 1% (p/v). Como o sulfato de estreptomicina precipita ácidos nucleicos, após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 6000 x g por 10 minutos à 4°C e os sobrenadantes utilizados para as análises de proteínas carboniladas.

4.4.2. Determinação das atividades enzimáticas

Todas as atividades enzimáticas foram determinadas por espectrofotometria em 20°C. A atividade da catalase foi determinada em 1 mL de sistema de reação, no espectrofotômetro Beckman DU640. As demais enzimas tiveram as suas atividades determinadas em microplacas e as leituras de absorbância foram realizadas no leitor de microplacas FLUOstar OPTIMA da BMG Labtech.

A atividade da hexoquinase (HK) foi determinada em sistema de reação contendo 50 mM de tampão Imidazol (pH 7,4), 2,0 mM de glicose, 2,0 mM de ATP, 10,0 mM de MgCl₂, 0,4 mM de NADP⁺, 1,0 mM de ditioneitol, 2,0 mM de KCl e 0,3 U/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Nesse caso, a glicose-6-fosfato formada na reação catalisada pela HK foi quantificada pela redução do NADP⁺ na presença de G6PDH. O aumento de absorbância foi monitorado em $\lambda=340$ nm (BALDWIN *et al.*, 2007).

A atividade da fosfofrutoquinase (PFK) foi determinada em sistema de reação contendo 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,2), 10 mM de MgCl₂, 1,0 mM de ATP, 150 μ M de NADH+H⁺, 2,0 mM de AMP, 250 mM de KCl, 1 U/mL de glicerolfosfato desidrogenase (GPDH), 1,2 U/mL de aldolase (ALD), 10 U/mL de triose fosfato isomerase (TPI) e 5,0 mM de frutose-6-fosfato. O princípio do método baseia-se na reação acoplada entre PFK, ALD, TPI e GPDH, onde a frutose-1,6-bisfosfato produzida pela PFK atua como substrato da ALD, que cliva a frutose-1,6-bisfosfato em gliceraldeído-3-fosfato (GAP) e diidroxiacetona-fosfato (DHAP). A TPI converte GAP em DHAP, que atua como substrato da GPDH, que então utiliza NADH+H⁺ para reduzir DHAP em glicerol-3-fosfato. A redução da absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (BALDWIN *et al.*, 2007).

A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi determinada em sistema de reação contendo 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,4), 1,0 mM de piruvato de sódio, 100 mM de KCl e 250 μ M de NADH+H⁺. O método tem como base a redução do piruvato em lactato, utilizando como agente redutor o NADH+H⁺, em reação catalisada pela LDH. A redução da absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (THUESEN *et al.*, 2005).

A atividade da citrato sintase (CS) foi determinada em sistema de reação contendo 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM de KCl, 1,0 mM de EDTA, 0,2 mM de DTNB, 0,2 mM de acetil-coenzima A e 0,5 mM de oxaloacetato. O método tem como base a condensação de oxaloacetato e acetil-coenzima A, em reação catalisada pela CS, formando citrato e coenzima A (CoA). A reação entre DTNB e o grupo tiol da CoA resulta na formação de complexo que absorve luz em $\lambda=410$ nm (SABOROWSKI & BUCHHOLZ, 2002).

A atividade da malato desidrogenase (MDH) foi determinada em sistema de reação contendo 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,4), 0,4 mM de oxaloacetato, 20 mM de $MgCl_2$ e 150 μ M de $NADH+H^+$. O princípio do método baseia-se na redução de oxaloacetato em malato, em reação catalisada pela MDH, com a oxidação de $NADH+H^+$. A redução da absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (CHILDRESS & SOMERO, 1979).

A atividade da glutathione redutase (GR) foi determinada em sistema de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 0,5 mM de EDTA, 1 mM de glutathione oxidada (GSSG) e 250 μ M de $NADPH+H^+$. O princípio do método baseia-se na redução da glutathione oxidada pela GR, formando glutathione reduzida, com o consumo de $NADPH+H^+$. A redução da absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm (LUSHCHAK & BAGNYUKOVA, 2006).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em sistema de reação contendo 100 mM de tampão carbonato de sódio (pH 10,2), 17,5 μ M de EDTA, 1 mM de NBT (cloreto de nitro azul tetrazólio). A reação teve o seu início pela adição de hidroxilamina para concentração final de 3,7 mM. O princípio da reação tem como base a geração de superóxido pela hidroxilamina em meio alcalino, que reduz NBT em formazan. Nesse caso, a SOD inibe a redução de NBT em formazan, que absorve luz em $\lambda=560$ nm (KONO, 1978).

A atividade da catalase (CAT) foi determinada em sistema de reação contendo 100 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,0), e 12 mM de H_2O_2 . A decomposição de H_2O_2 pela CAT reduz a absorbância em $\lambda=240$ nm (REGOLI *et al.*, 1997).

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi determinada em sistema de reação contendo 100 mM de tampão fosfato de sódio (pH 6,5), 1,5 mM de 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 1 mM de glutathione reduzida (GSH). O princípio do método baseia-se na conjugação entre CDBN e GSH, em reação catalisada pela

GST. O produto formado nessa reação absorve luz em $\lambda=340$ nm (REGOLI *et al.*, 1997).

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi determinada em sistema de reação contendo 100 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,4), 1,0 mM de glicose-6-fosfato e 0,2 mM de NADP⁺. O princípio do método baseia-se na reação de oxidação de glicose-6-fosfato catalisada pela G6PDH, com a formação de NADPH+H⁺, que absorve luz em $\lambda=340$ nm (CIARDIELLO *et al.*, 1995).

A atividade da arginase (ARG) foi determinada como descrito por Iyamu *et al.* (2008) com modificações. As determinações foram conduzidas em microplacas de 96 poços. O sistema de reação foi composto por 50 mM de tampão glicina (pH 9,5), 100 mM de L-arginina (pH 9,5) e 1 mM de MnCl₂. Após incubação em 20°C (15 e 240 minutos para brânquias e pé muscular, respectivamente), as reações foram paradas com adição de HCl 0,78 M, para uma concentração final de 0,0625 M. Em seguida, foi adicionado Ninidrina 6% (p/v), dissolvida em 2-metoxietanol. As placas foram seladas com SealPlate®, e após 60 minutos em 85°C, uma alíquota de 70 µL das reações foram transferidas para placas de 384 poços e as absorbâncias foram determinadas em $\lambda=520$ nm. O princípio do método baseia-se na hidrólise de L-arginina em L-ornitina e ureia, em reação catalisada pela ARG. Em meio ácido, a L-ornitina formada na reação, reage com a ninidrina formando um produto que absorve luz em $\lambda=520$ nm.

As atividades das enzimas HK, PFK, LDH, MDH, CS, GR, SOD, CAT, G6PDH, e ARG foram determinadas nas brânquias e pé muscular, embora os níveis de GR muscular tenham ficado abaixo do limite de detecção. Na glândula digestiva foram determinadas as atividades das enzimas GR, SOD, CAT e GST.

As atividades enzimáticas foram normalizadas em função da concentração proteica dos homogeneizados. A atividade específica de todas as enzimas foi expressa em µmol/minuto (U) ou nmol/minuto (mU). Assim, a atividade específica das enzimas foi expressa em U/mg de proteína ou mU/mg de proteína. A concentração proteica das amostras foi determinada pelo método BCA (bicinchoninic acid), similar ao método de Lowry, utilizando o Kit QuantiPro BCA da Sigma e soro albumina bovina (SAB) como padrão. O princípio do método baseia-se na formação do complexo proteína-Cu²⁺ em solução alcalina, seguida da redução de Cu²⁺ para Cu⁺. A formação de cobre reduzido é proporcional à quantidade de proteína e a sua reação com o BCA, em meio alcalino, absorve luz em $\lambda=560$ nm.

4.4.3. Peroxidação de Lipídeos

A peroxidação lipídica foi determinada na glândula digestiva pelo método FOX, incubando alíquota das amostras com o reativo de trabalho, contendo 95,75% de metanol, 100 μM de Xilenol Laranja, 25 mM de H_2SO_4 , 4 mM de BHT (hidroxitolueno butilado) e 250 μM de $\text{FeSO}_4\cdot\text{NH}_4$. O princípio do método baseia-se na oxidação do Fe^{2+} por hidroperóxidos em meio ácido, o qual forma complexo com o xilenol laranja, absorvendo luz em $\lambda=560$ nm (JIANG *et al.*, 1991; JIANG *et al.*, 1992). Os resultados foram normalizados em função da concentração proteica das amostras e expressos em nmol/mg proteína.

4.4.4. Carbonilação de Proteínas

Os níveis de proteínas carboniladas foram determinados na glândula digestiva de acordo com o método descrito por Levine *et al.* (1990) e Quinlan & Gutteridge (2000). Amostras livres de ácidos nucleicos foram incubadas a 37°C durante 90 minutos com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM. Os brancos foram preparados com HCl 2 M no lugar de DNPH. Após a incubação, foi adicionado ácido tricloroacético 28% (p/v) e os tubos foram centrifugados a 6000rpm por 3 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram lavados três vezes com etanol – acetato de etilo 1:1 (v/v), seguido de centrifugação a 6000rpm por 6 minutos entre cada lavagem. Os sedimentos foram ressuspensos em hidrocloreto de guanidina 6 M e os tubos foram centrifugados a 6000 rpm por 3 minutos. O princípio do método baseia-se na reação entre DNPH e proteínas carboniladas formando dinitrofenilhidrazona que absorve luz em $\lambda=360$ nm. O cálculo de proteínas carboniladas foi realizado utilizando o coeficiente de extinção molar das hidrazonas ($2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram normalizados em função da concentração proteica das amostras e expressos em nmol/mg proteína.

4.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistica para Windows. Os resultados foram expressos como média \pm SEM (erro padrão da média). A análise de variância (ANOVA) unifatorial foi utilizado para comparar os grupos controle experimental e referência da natureza. A comparação entre os grupos com tratamentos diferentes (interação dos fatores temperatura, salinidade e diesel) foi conduzida utilizando ANOVA trifatorial com teste Tukey *a posteriori*. O teste de Levene foi utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias e, quando necessário, os dados foram transformados aplicando logaritmo (\log_{10}). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Todos os bioensaios foram iniciados com 10 animais, contudo, ao longo dos experimentos, foram constatadas algumas mortes. A tabela 1 apresenta os números finais de organismos sobreviventes no tempo experimental de 8 dias.

TABELA 1. NÚMERO DE *Nacella concinna* VIVAS AO FINAL DO PERÍODO EXPERIMENTAL.

Tratamento	Condições Termo-Salinas			
	0°C, 35psu	0°C, 25psu	4°C, 35psu	4°C, 25psu
Controle	n=10	n=10	n=9	n=10
Diesel 1%	n=8	n=10	n=10	n=7
Diesel 5%	n=10	n=10	n=10	n=9

FONTE: O AUTOR (2013).

Nos tratamentos com óleo diesel os gastrópodes não aderiram à parede lateral dos aquários devido à formação de uma película de diesel, permanecendo no fundo e dificultando a identificação dos espécimes mortos. A identificação dos animais vivos foi realizada estimulando mecanicamente o pé muscular com um leve toque manual, no momento em que os aquários estavam vazios durante a troca de água.

Contudo, em todas as condições termo-salinas com diesel os animais se mostraram bastante debilitados, principalmente em 0-35, ambas as condições com diesel, e em 4-25, com 5% de diesel. Os movimentos do pé muscular e dos tentáculos cefálicos eram muito lentos e escassos, bem como respondiam muito pouco ao estímulo mecânico realizado no pé muscular como prova de vida. Já nas condições termo-salinas 0-25, e principalmente em 4-35, os gastrópodes se mostraram menos debilitados e responderam bem ao estímulo mecânico do pé muscular.

No momento da dissecação foi observado que alguns patelídeos apresentavam acúmulo de fluído na cavidade do manto, em especial em 0-25 com diesel a 5% e em 4-25 com diesel a 1%. Em cada uma dessas duas condições, cinco animais acumularam fluído na cavidade do manto. Em 4-25 com diesel a 5%, apesar de vivos, os gastrópodes foram facilmente removidos da concha no momento da dissecação. Em todos os experimentos com diesel, os animais apresentaram um odor fétido ao serem retirados da concha.

5.1. Controle Experimental vs Referencial da Natureza

Os resultados das análises bioquímicas na glândula digestiva de *N. concinna* estão sumarizadas na figura 11. Com exceção da SOD ($p < 0,05$) que apresentou níveis significativamente menores no grupo referência da natureza, os níveis das demais enzimas e dos marcadores LPO e PCO, foram estatisticamente iguais ao do grupo controle experimental 0-35.

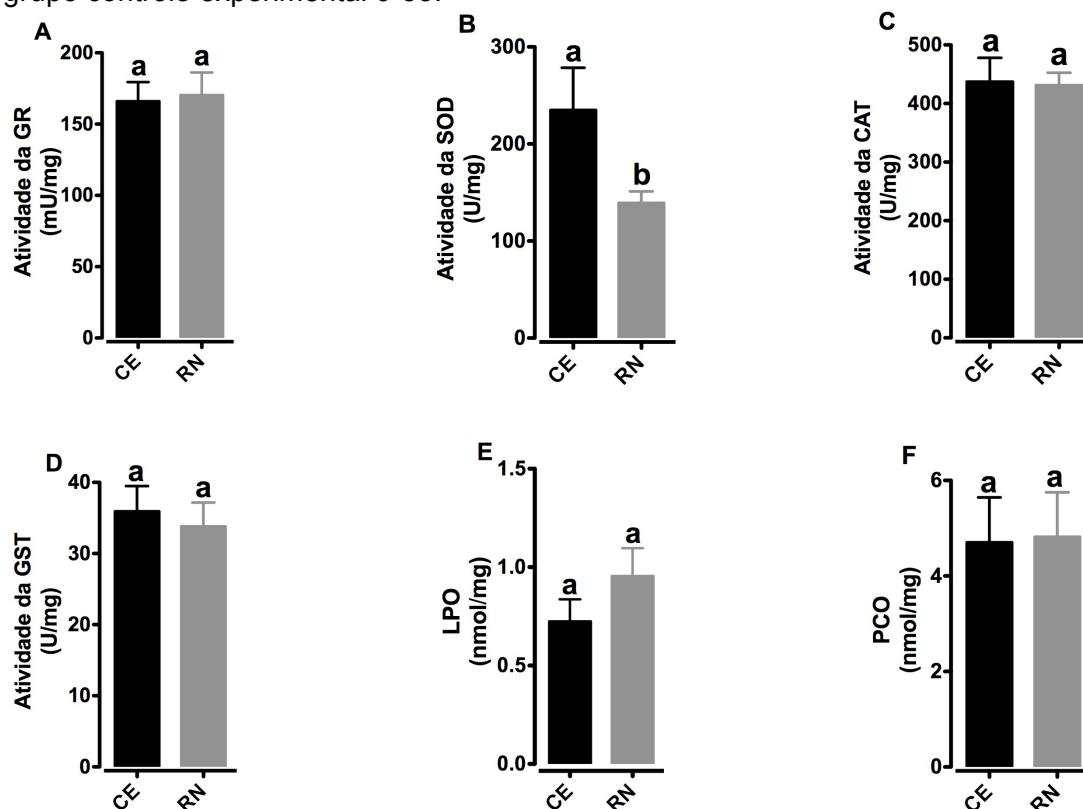


FIGURA 11. NÍVEIS ENZIMÁTICOS DA DEFESA ANTIOXIDANTE E MARCADORES DE LESÃO OXIDATIVA DA GLÂNDULA DIGESTIVA DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS CONTEMPLAM OS NÍVEIS MÉDIOS (MÉDIA \pm ERRO PADRÃO) DOS GRUPOS CONTROLE EXPERIMENTAL (CE) E REFERÊNCIA DA NATUREZA (RN). LETRAS MINÚSCULAS DISTINTAS SOBRE AS BARRAS INDICAM MÉDIAS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. (A) GLUTATIONA REDUTASE (GR); (B) SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD); (C) CATALASE (CAT); (D) GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST); (E) PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO); (F) CARBONILAÇÃO PROTEICA (PCO). FONTE: O AUTOR (2013).

Os resultados das análises bioquímicas nas brânquias estão sumarizados na figura 12. Os níveis de CS e LDH foram menores no grupo referência da natureza do que no controle experimental 0-35 ($p < 0,05$). Já os níveis de SOD foram maiores no grupo referência da natureza do que no controle experimental 0-35 ($p < 0,001$). Os demais marcadores analisados não apresentaram diferenças significativas.

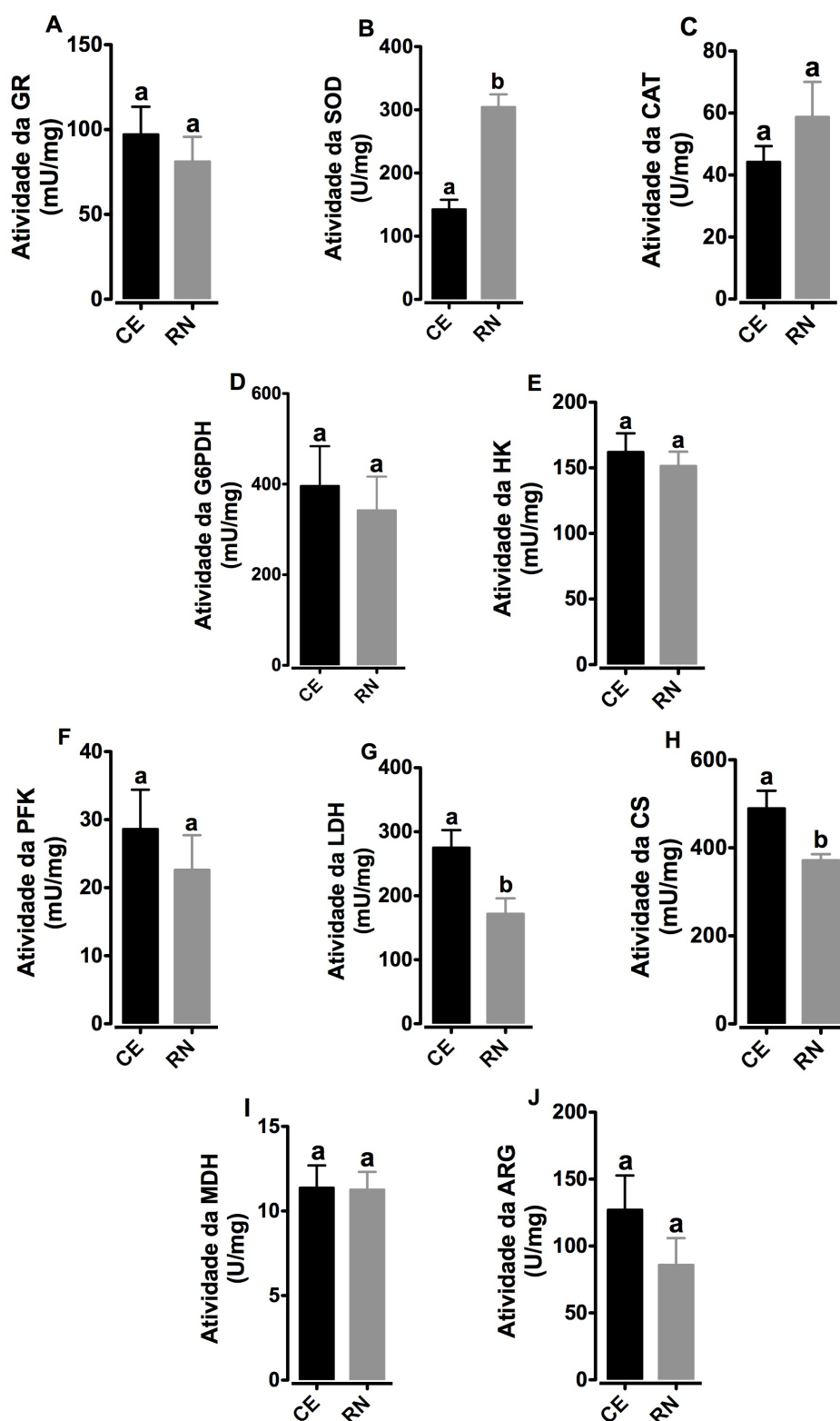


FIGURA 12. NÍVEIS ENZIMÁTICOS DA DEFESA ANTIOXIDANTE, METABOLISMO ARGININOLÍTICO E ENERGÉTICO DAS BRÂNQUIAS DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS CONTEMPLAM OS NÍVEIS MÉDIOS (MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DOS GRUPOS CONTROLE EXPERIMENTAL (CE) E REFERÊNCIA DA NATUREZA (RN). LETRAS MINÚSCULAS DISTINTAS SOBRE AS BARRAS INDICAM MÉDIAS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. (A) GLUTATIONA REDUTASE (GR); (B) SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD); (C) CATALASE (CAT); (D) GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH); (E) HEXOQUINASE (HK); (F) FOSFOFRUTOQUINASE (PFK); (G) LACTATO DESIDROGENASE (LDH); (H) CITRATO SINTASE (CS); (I) MALATO DESIDROGENASE (MDH); (J) ARGINASE (ARG). FONTE: O AUTOR (2013).

Os resultados das análises bioquímicas no pé muscular estão sumarizados na figura 13. Os níveis de MDH, LDH ($p < 0,05$) e ARG ($p < 0,01$) foram menores no grupo referência da natureza em relação ao grupo controle experimental 0-35. Por outro lado, os níveis de SOD ($p < 0,05$) e CAT ($p < 0,001$) foram maiores no grupo referência da natureza em relação ao grupo controle experimental 0-35. As demais enzimas apresentaram níveis musculares estatisticamente iguais.

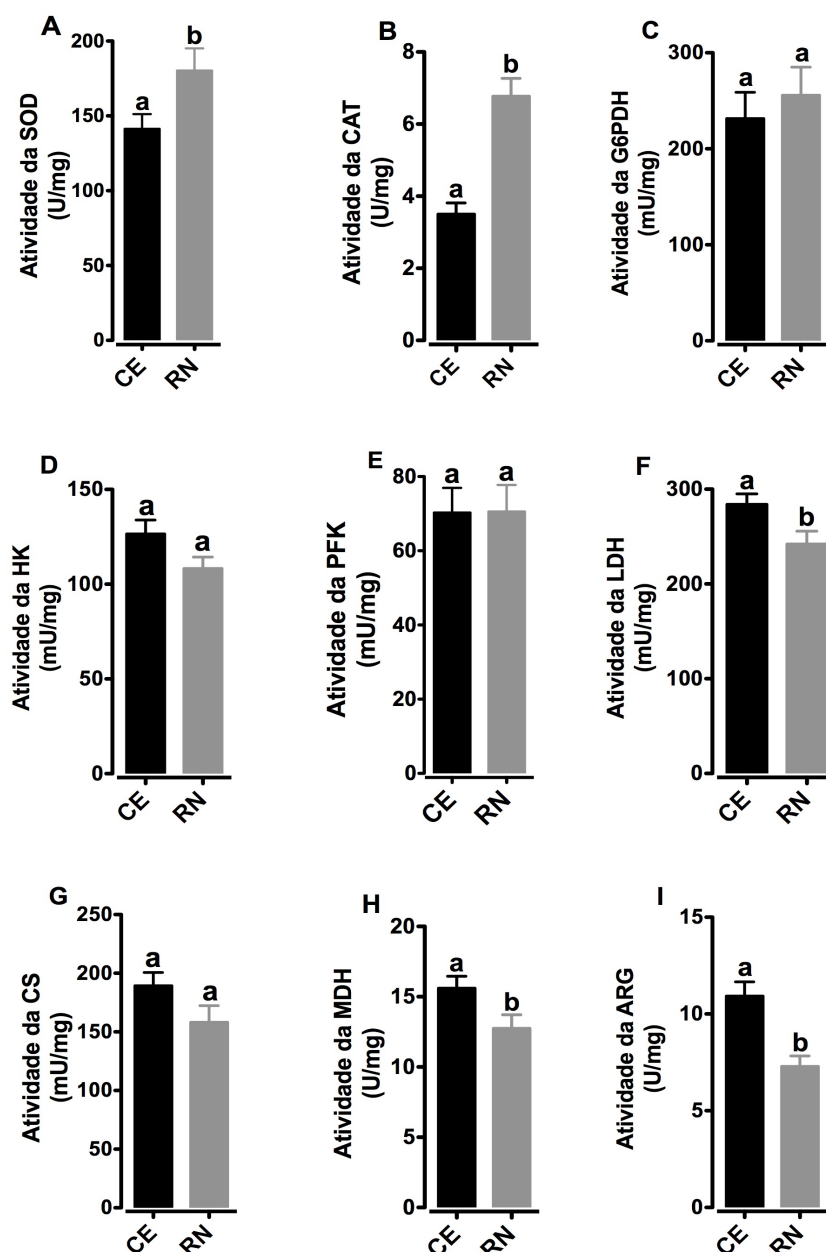


FIGURA 13. NÍVEIS ENZIMÁTICOS DA DEFESA ANTIOXIDANTE, METABOLISMO ARGININOLÍTICO E ENERGÉTICO DO PÉ MUSCULAR DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS CONTEMPLAM OS NÍVEIS MÉDIOS (MÉDIA \pm ERRO PADRÃO) DOS GRUPOS CONTROLE EXPERIMENTAL (CE) E REFERÊNCIA DA NATUREZA (RN). LETRAS MINÚSCULAS DISTINTAS SOBRE AS BARRAS INDICAM MÉDIAS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. (A) SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD); (B) CATALASE (CAT); (C) GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH); (D) HEXOQUINASE (HK); (E) FOSFOFRUTOQUINASE (PFK); (F) LACTATO DESIDROGENASE (LDH); (G) CITRATO SINTASE (CS); (H) MALATO DESIDROGENASE (MDH); (I) ARGINASE (ARG). FONTE: O AUTOR (2013).

5.2. Glândula Digestiva

O óleo diesel foi capaz de elevar os níveis de GR na glândula digestiva de *N. concinna*, tendo sido mais evidente na condição diesel 1%. Embora o aquecimento em 4°C não tenha sido capaz de modular os níveis de GR, uma leve interação termo-salina ficou evidente. Para avaliar os efeitos do diesel e da interação termo-salina apontados na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados. Assim, diesel 1% e 5%, bem como os controles experimentais, foram agrupados independentemente da condição termo-salina (FIGURA 14B). Já para verificar a interação temperatura-salinidade, os resultados foram agrupados de acordo com a condição termo-salina, sem considerar a presença ou ausência de diesel (FIGURA 14C). Apesar da ANOVA trifatorial apontar a existência de uma interação termo-salina, não foram observadas diferenças entre as quatro condições termo-salinas experimentais no teste Tukey. Os resultados estão sumarizados na figura 14.

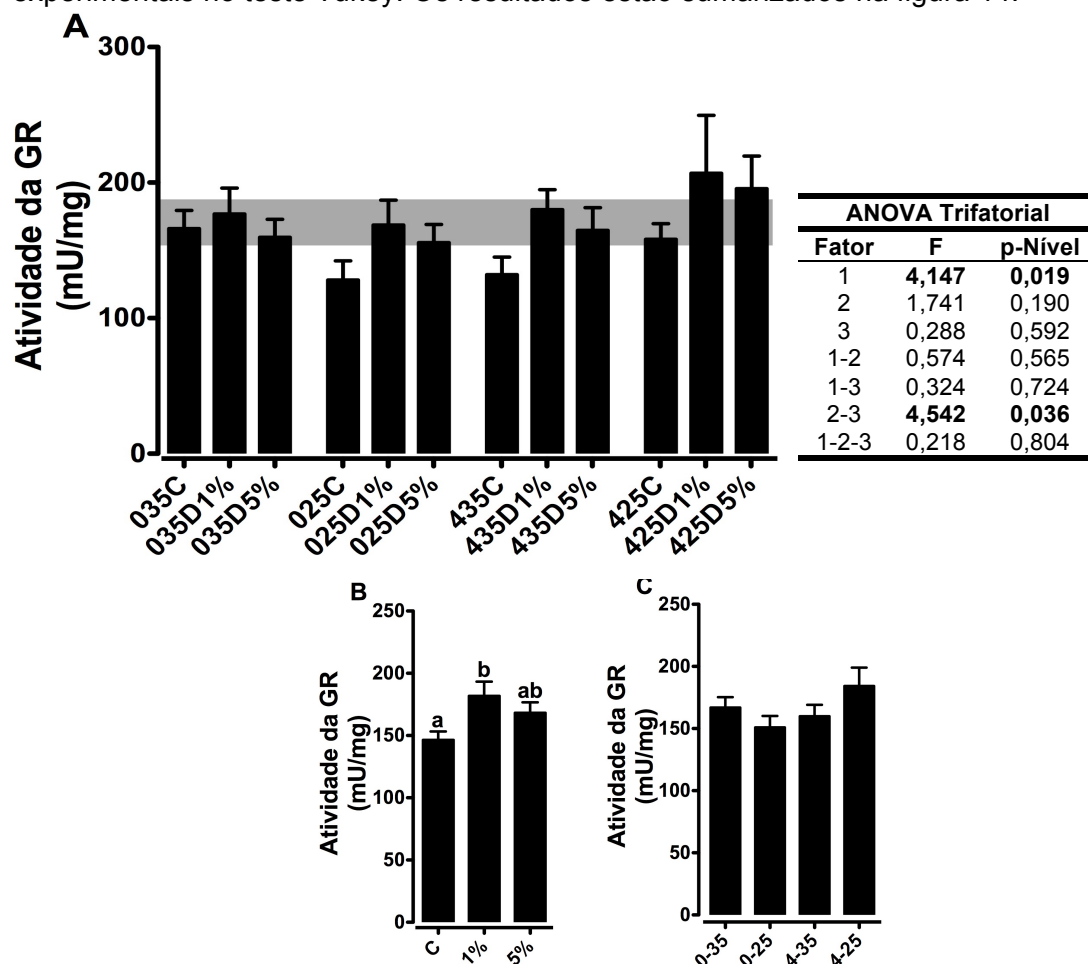


FIGURA 14. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE GR DA GLÂNDULA DIGESTIVA DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE GR DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); EFEITO DO DIESEL (B); E EFEITO DA INTERAÇÃO TERMO-SALINA (C) SOBRE OS NÍVEIS DE GR. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

O aquecimento em 4°C e a presença de óleo diesel foram capazes de elevar, isoladamente, os níveis de SOD na glândula digestiva. A variação de salinidade não foi capaz de alterar significativamente os níveis de SOD nesse tecido. Também não ficaram evidentes as possíveis interações entre óleo diesel, temperatura e salinidade. Para avaliar os efeitos do diesel e da temperatura apontados na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados. Dessa forma, diesel 1% e 5%, bem como os controles experimentais, foram agrupados independentemente da condição termo-salina (FIGURA 15B). Já para verificar o efeito da temperatura, os resultados foram agrupados de acordo com a condição térmica (0 e 4°C), sem considerar a presença ou ausência de diesel, e a salinidade (FIGURA 15C). Os resultados estão sumarizados na figura 15.

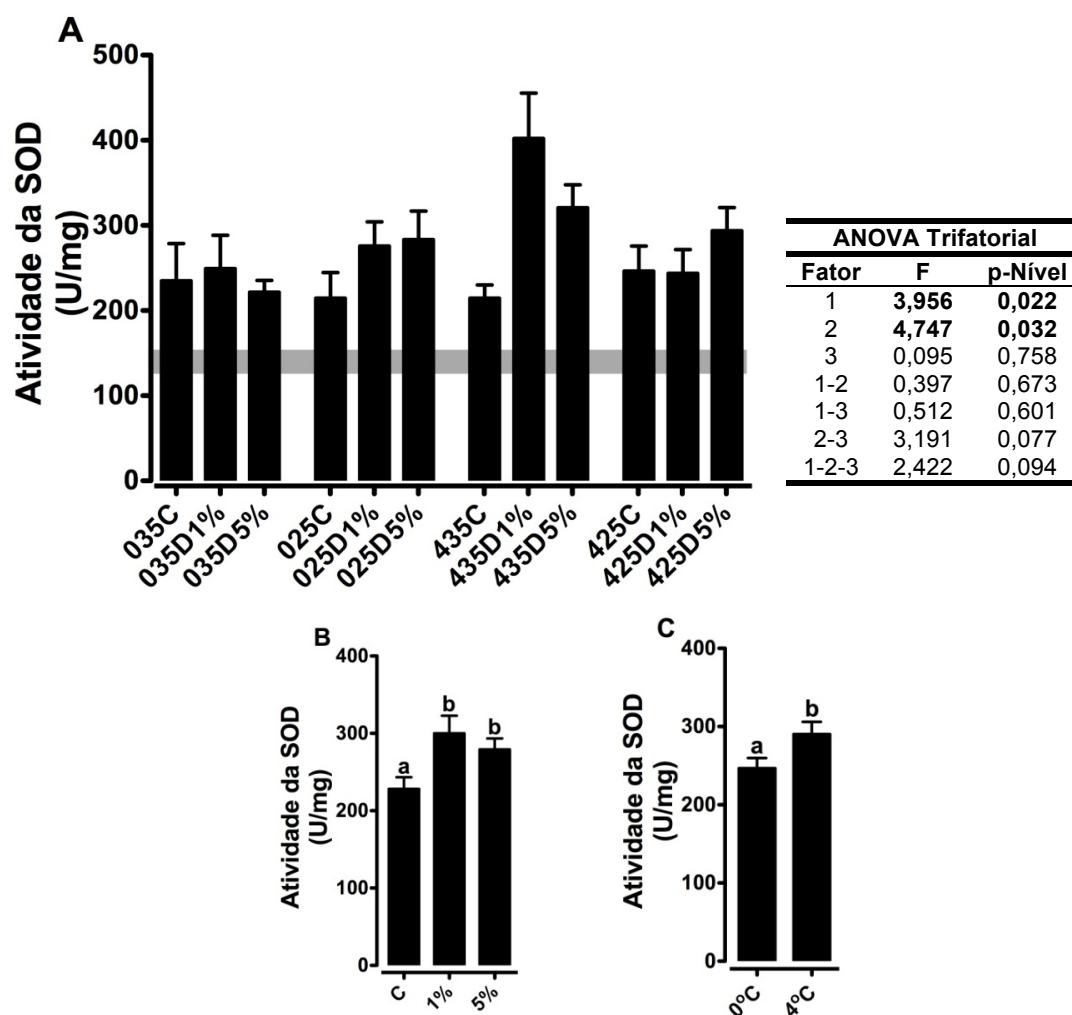


FIGURA 15. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE SOD DA GLÂNDULA DIGESTIVA DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE SOD DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); EFEITO DO DIESEL (B); E EFEITO DE TEMPERATURA (C) SOBRE OS NÍVEIS DE SOD. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

Os níveis de CAT da glândula digestiva de *N. concinna* não foram modulados por alterações de temperatura, salinidade e óleo diesel. Também não foram observadas interações entre esses três fatores. Os resultados estão sumarizados na figura 16.

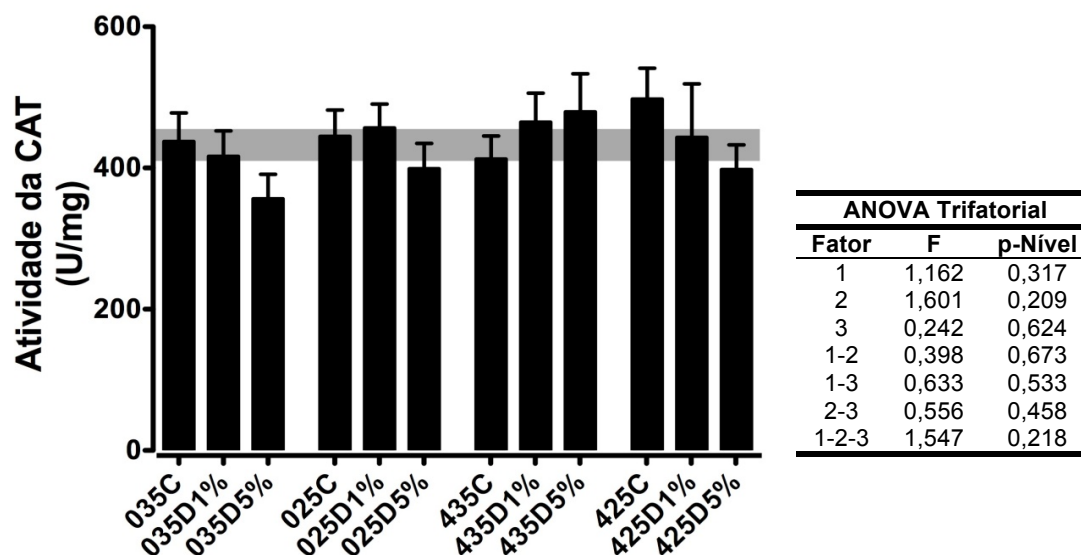


FIGURA 16. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE CAT DA GLÂNDULA DIGESTIVA DE *Nacella concinna*. O GRÁFICO MOSTRA TODOS OS FATORES ASSOCIADOS, COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE CAT DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA). A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

A presença de óleo diesel e a redução da salinidade não foram capazes de alterar os níveis de GST da glândula digestiva. Por outro lado, o aquecimento em 4°C elevou os níveis dessa enzima. A interação temperatura-salinidade foi capaz de modular os níveis de GST na glândula digestiva. Também ficou evidente que os níveis de GST variam em função da interação termo-salina-diesel. Como a ANOVA trifatorial apontou uma interação termo-salina mais forte ($p=0,01$) do que a interação termo-salina-diesel ($p=0,03$) capaz de modular os níveis de GST, os resultados foram agrupados de acordo com a condição termo-salina, sem considerar a presença ou ausência de diesel (FIGURA 17B). A existência das interações termo-salina e termo-salina-diesel inviabilizou o agrupamento dos dados para avaliação do efeito de temperatura isoladamente. Os resultados estão sumarizados na figura 17.

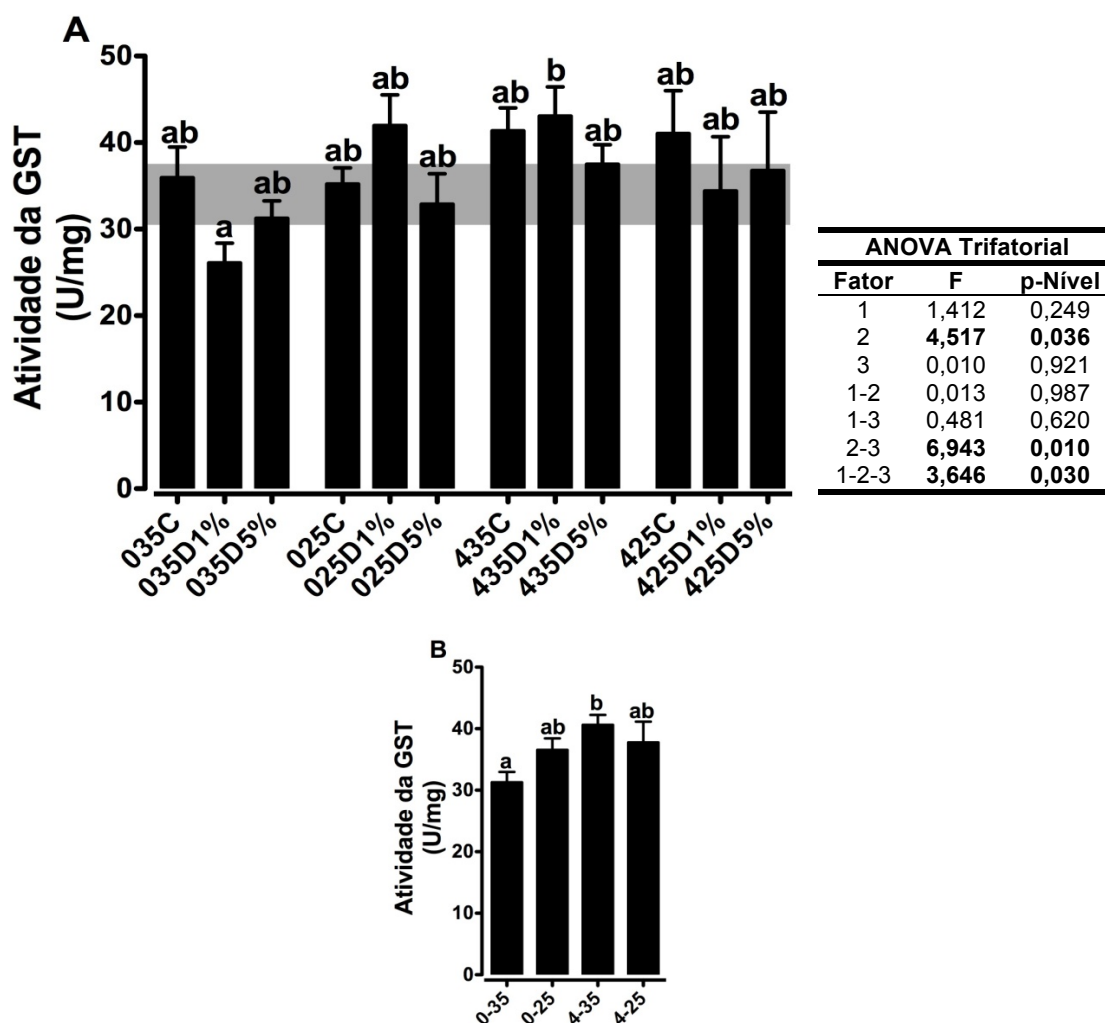


FIGURA 17. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE GST DA GLÂNDULA DIGESTIVA DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS COM O RESULTADO DA INTERAÇÃO ENTRE DIESEL, TEMPERATURA E SALINIDADE (A), E OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE GST DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); E A INTERAÇÃO TERMO-SALINA (B) SOBRE OS NÍVEIS DE GST. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

A presença de óleo diesel foi capaz de elevar os níveis de LPO na glândula digestiva. Esse efeito foi dose dependente e ficou mais evidente nas condições termo-salinas 0-35, 0-25 e 4-25. Os níveis de LPO na salinidade 25 foram mais elevados do que na salinidade de 35. Por outro lado, aquecimento em 4°C não foi capaz de alterar os níveis de peroxidação lipídica em relação a condição térmica em 0°C. Contudo, ficou evidente que a interação temperatura-salinidade é capaz de modular o efeito do óleo diesel na peroxidação lipídica. Para avaliar os efeitos do diesel e da interação termo-salina apontados na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados. Assim, diesel 1% e 5%, bem como os controles experimentais, foram agrupados independentemente da condição termo-salina (FIGURA 18B). Já para verificar a interação temperatura-salinidade, os resultados foram agrupados de

acordo com a condição termo-salina, sem considerar a presença ou ausência de diesel (FIGURA 18C). A existência da interação termo-salina inviabilizou o agrupamento dos dados para avaliação do efeito de salinidade isoladamente. Os resultados estão sumarizados na figura 18.

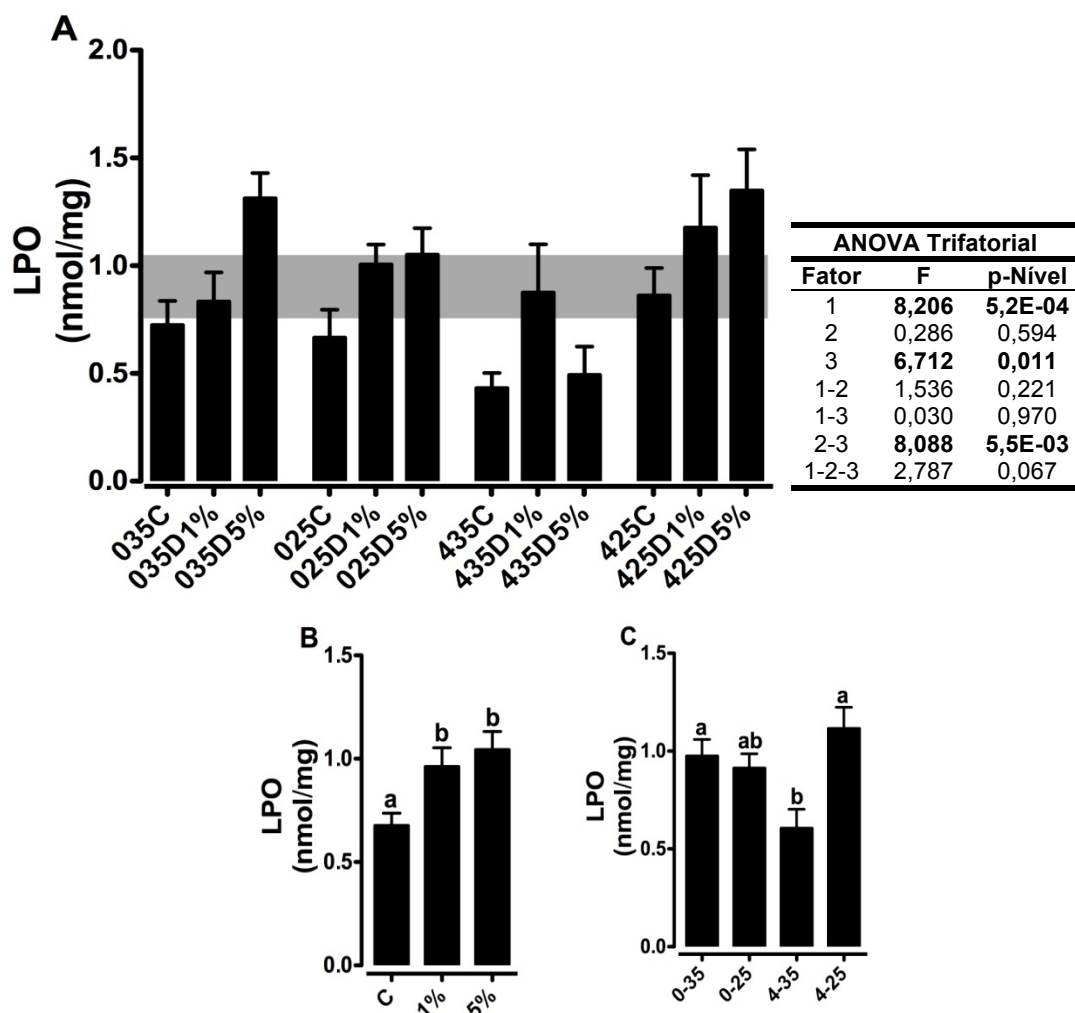


FIGURA 18. EFEITO DO ÓLEO DIESEL NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) DA GLÂNDULA DIGESTIVA DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE LPO DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); EFEITO DO DIESEL (B); E INTERAÇÃO TERMO-SALINA (C) SOBRE OS NÍVEIS DE LPO. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

A presença de óleo diesel não foi capaz de alterar os níveis de PCO na glândula digestiva. Contudo, o aumento da temperatura e a redução da salinidade, independentemente, foram capazes de reduzir os níveis de PCO na glândula digestiva. Esse efeito ficou mais evidente na condição termo-salina 4-25. Para avaliar os efeitos da temperatura e da salinidade apontados na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados. Para avaliar o efeito da temperatura, os resultados foram agrupados de acordo com a condição térmica (0 e 4°C), sem considerar a

presença ou ausência de diesel, e a salinidade (FIGURA 19B). Já para avaliar o efeito da salinidade, resultados foram agrupados de acordo com a condição salina (35 e 25 psu), sem considerar a presença ou ausência de diesel, e a temperatura (FIGURA 19C). Os resultados estão sumarizados na figura 19. Na tabela 2, estão sumarizados todos os resultados obtidos na glândula digestiva de *N. concinna* no presente estudo.

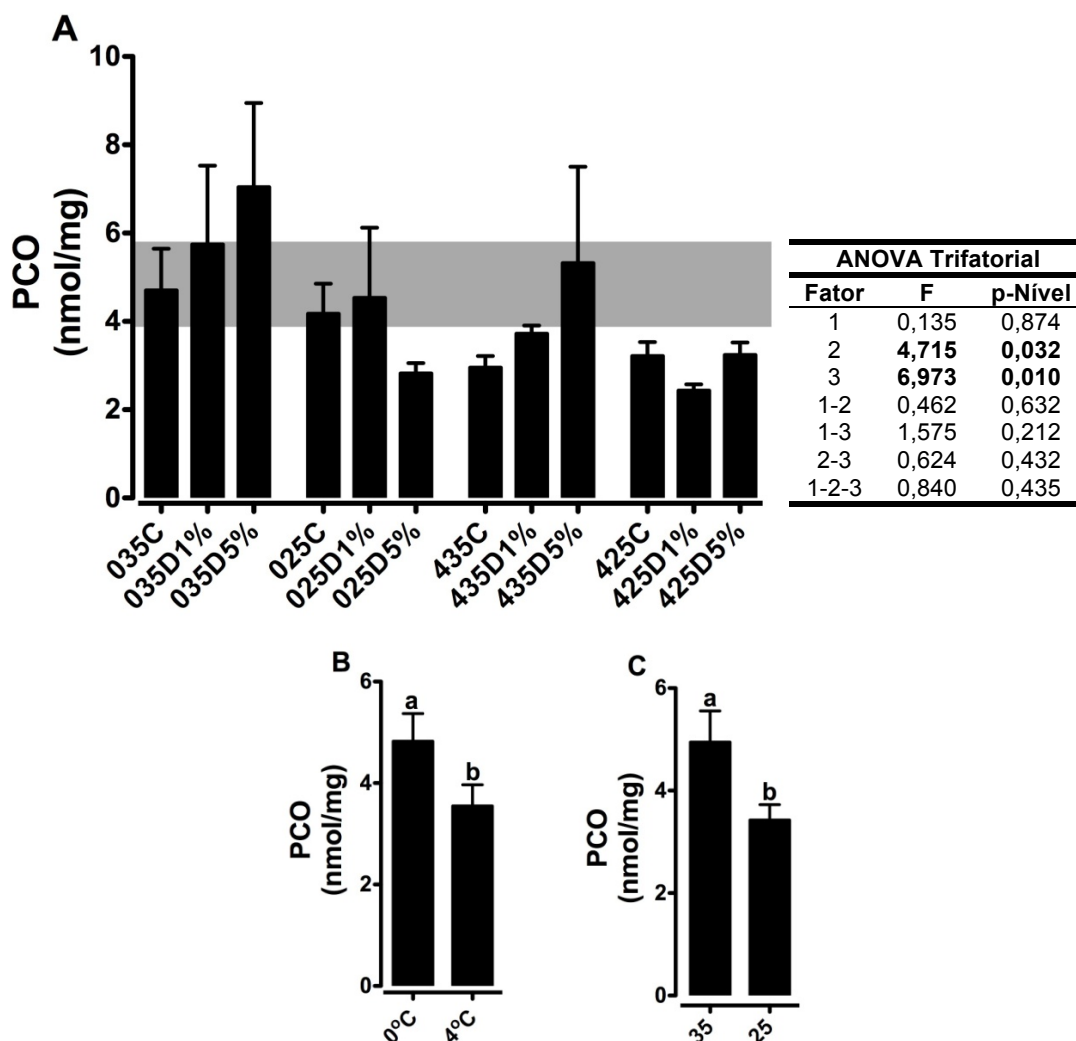


FIGURA 19. EFEITO DO ÓLEO DIESEL NA CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS (PCO) DA GLÂNDULA DIGESTIVA DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE PCO DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); EFEITO DE TEMPERATURA (B); E EFEITO DE SALINIDADE (C) SOBRE OS NÍVEIS DE PCO. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

TABELA 2. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS PARÂMETROS ANALISADOS NA GLÂNDULA DIGESTIVA DE *Nacella concinna*. (↑) E (↓) INDICAM AUMENTO E DIMINUIÇÃO NOS NÍVEIS DOSADOS, RESPECTIVAMENTE; (★) INDICA EXISTÊNCIA DE INTERAÇÕES; (–) INDICA QUE NÃO FORAM VERIFICADAS ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DOSADOS; OS NÚMEROS REPRESENTAM OS FATORES AVALIADOS, SENDO DIESEL (1), AQUECIMENTO EM 4°C (2) E BAIXA SALINIDADE EM 25psu (3).

Glândula Digestiva – ANOVA Trifatorial							
Parâmetros	Fatores Isolados			Interações			
	1	2	3	1-2	1-3	2-3	1-2-3
GR	↑	–	–	–	–	★	–
SOD	↑	↑	–	–	–	–	–
CAT	–	–	–	–	–	–	–
GST	–	↑	–	–	–	★	★
LPO	↑	–	↑	–	–	★	–
PCO	–	↓	↓	–	–	–	–

FONTE: O AUTOR (2013).

5.3. Brânquias

A exposição dos animais ao diesel modulou positivamente os níveis de GR nas brânquias de *N. concinna* de forma dose dependente em quase todas as condições termo-salinas, exceto em 4-35, onde o aumento de GR não foi dose-dependente. As variações de salinidade ou temperatura sozinhas não foram capazes de causar mudanças significativas nos níveis de GR. Também não foram observadas interações entre os fatores diesel, salinidade e temperatura capazes de afetar significativamente os níveis de GR branquial. Para avaliar o efeito do diesel apontado na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados em controles, diesel 1% e diesel 5% independentemente da condição termo-salina (FIGURA 20B). Os resultados estão sumarizados na figura 20.

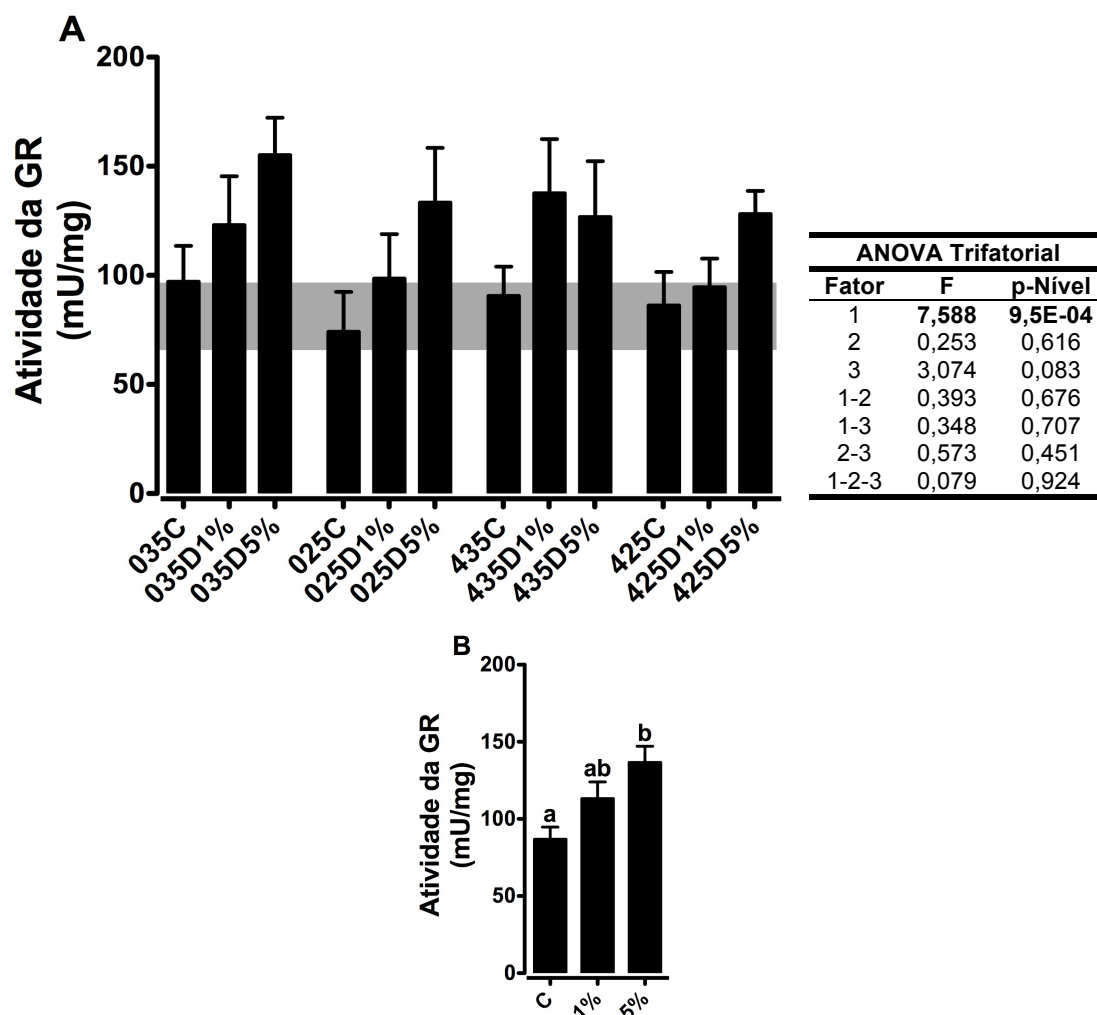


FIGURA 20. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE GR DAS BRÂNKIAS DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE GR DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); E EFEITO DO DIESEL (B) SOBRE OS NÍVEIS DE GR. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

O óleo diesel não foi capaz de alterar significativamente os níveis branquiais de SOD, no entanto, as variações de temperatura e de salinidade foram capazes de modular os níveis dessa enzima. O aquecimento em 4°C foi capaz de elevar expressivamente os níveis branquiais de SOD. A salinidade em 25 também foi capaz de elevar os níveis de SOD, mas de forma mais discreta. Os maiores valores de atividade dessa enzima foram observados na condição termo-salina 4-25. Para avaliar os efeitos da temperatura e da salinidade apontados na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados. Dessa forma, o efeito da temperatura foi avaliado agrupando-se os resultados de acordo com a condição térmica (0 e 4°C), sem considerar a presença ou ausência de diesel, e a salinidade (FIGURA 21B). Já para avaliar o efeito da salinidade, resultados foram agrupados de acordo com a condição

salina (35 e 25 psu), sem considerar a presença ou ausência de diesel, e a temperatura (FIGURA 21C). Os resultados então sumarizados na figura 21.

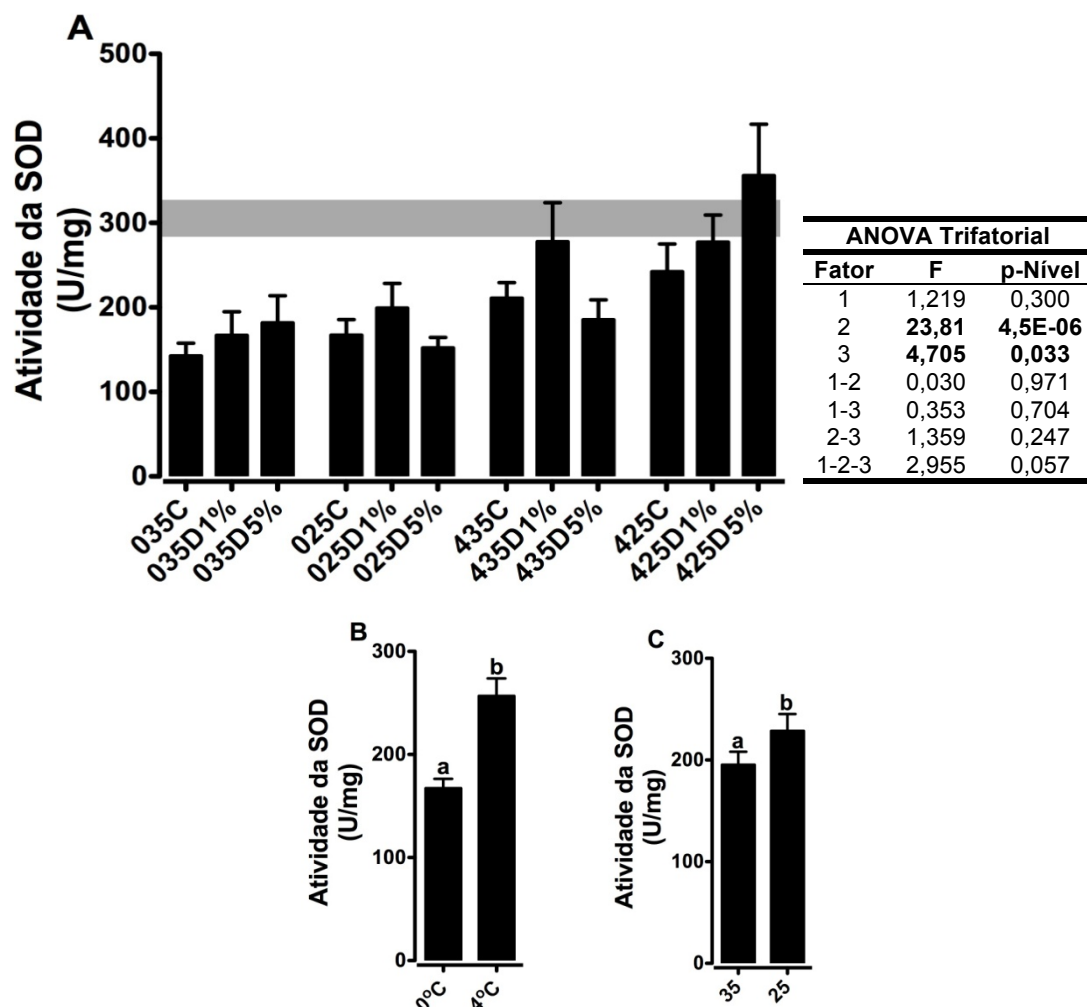


FIGURA 21. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE SOD DAS BRÂNKIAS DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE SOD DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); EFEITO DE TEMPERATURA (B) E SALINIDADE (C) SOBRE OS NÍVEIS DE SOD. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

Os níveis branquiais de CAT foram expressivamente menores na presença de óleo diesel. Esse efeito foi dose-dependente e as menores atividades foram observadas no diesel 5%. O aquecimento em 4°C também foi capaz de modular negativamente os níveis enzimáticos. Não foram observados efeitos significativos nos níveis de CAT decorrentes de variação de salinidade. Também não foram observadas interações entre os três fatores. Para avaliar os efeitos do diesel e da temperatura apontados na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados. Assim, diesel 1% e 5%, bem como os controles experimentais, foram agrupados independentemente da condição termo-salina (FIGURA 22B). Já para verificar o efeito da temperatura, os resultados foram agrupados de acordo com a condição

térmica (0 e 4°C), sem considerar a presença ou ausência de diesel, e a salinidade (FIGURA 22C). Os resultados estão sumarizados na figura 22.

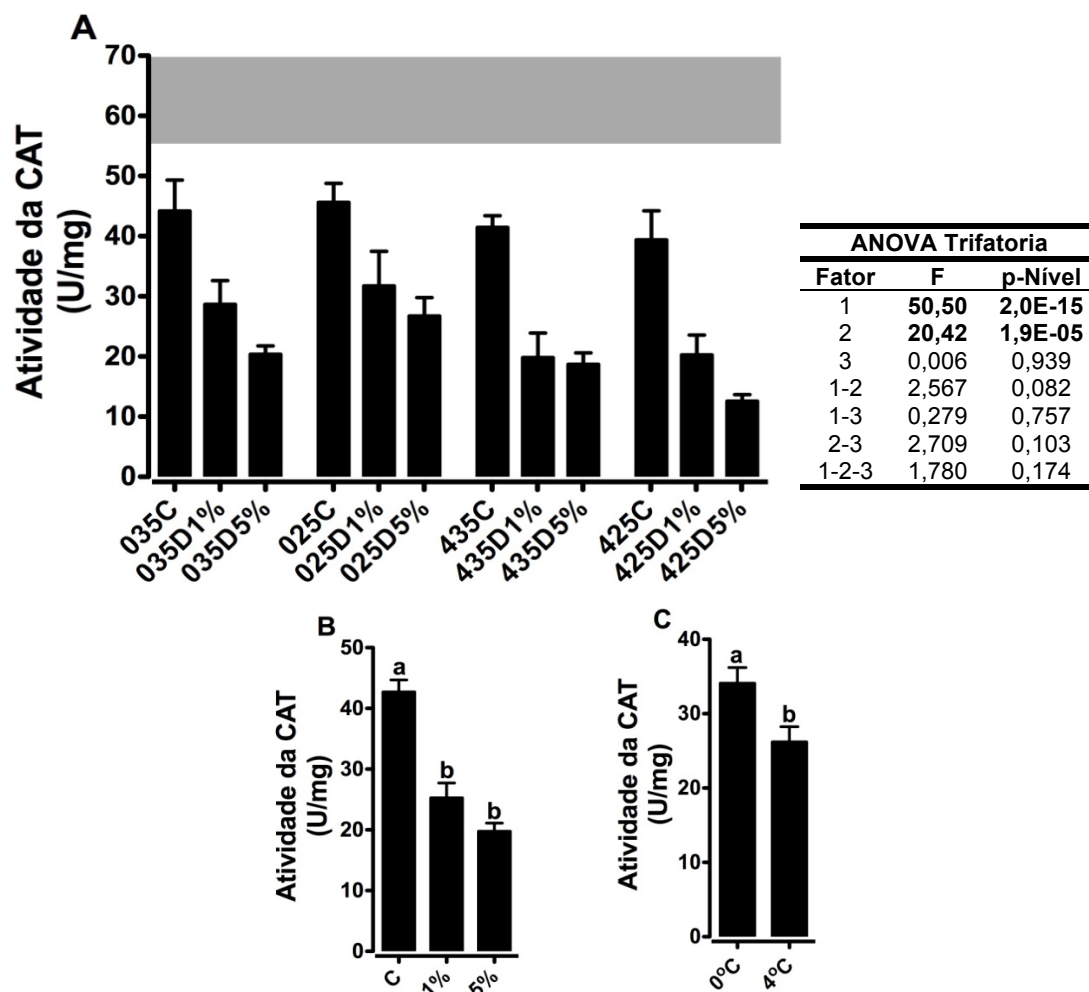


FIGURA 22. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE CAT DAS BRÂNKIAS DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE CAT DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); EFEITO DO DIESEL (B) E DE TEMPERATURA (C) SOBRE OS NÍVEIS DE CAT. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

Os níveis branquiais de G6PDH foram modulados negativamente pelo óleo diesel. Esse efeito foi dose-dependente e ficou bem evidente nas condições termo-salinas 0-35 e 4-25. O aquecimento em 4°C foi capaz de modular negativamente os níveis de G6PDH branquial comparado a condição térmica de 0°C. Já a salinidade em 25 foi capaz provocar um leve aumento nos níveis de G6PDH, quando comparado à salinidade de 35. Não foram observadas interações entre os três fatores. Para avaliar os efeitos do diesel, da temperatura e da salinidade apontados na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados. Dessa forma, diesel 1% e 5%, bem como os controles experimentais, foram agrupados independentemente da

condição termo-salina (FIGURA 23B). Para verificar o efeito da temperatura, os resultados foram agrupados de acordo com a condição térmica (0 e 4°C), sem considerar a presença ou ausência de diesel, e a salinidade (FIGURA 23C). Já para avaliar o efeito da salinidade, resultados foram agrupados de acordo com a condição salina (35 e 25 psu), sem considerar a presença ou ausência de diesel, e a temperatura (FIGURA 23D). O resultados estão sumarizados na figura 23.

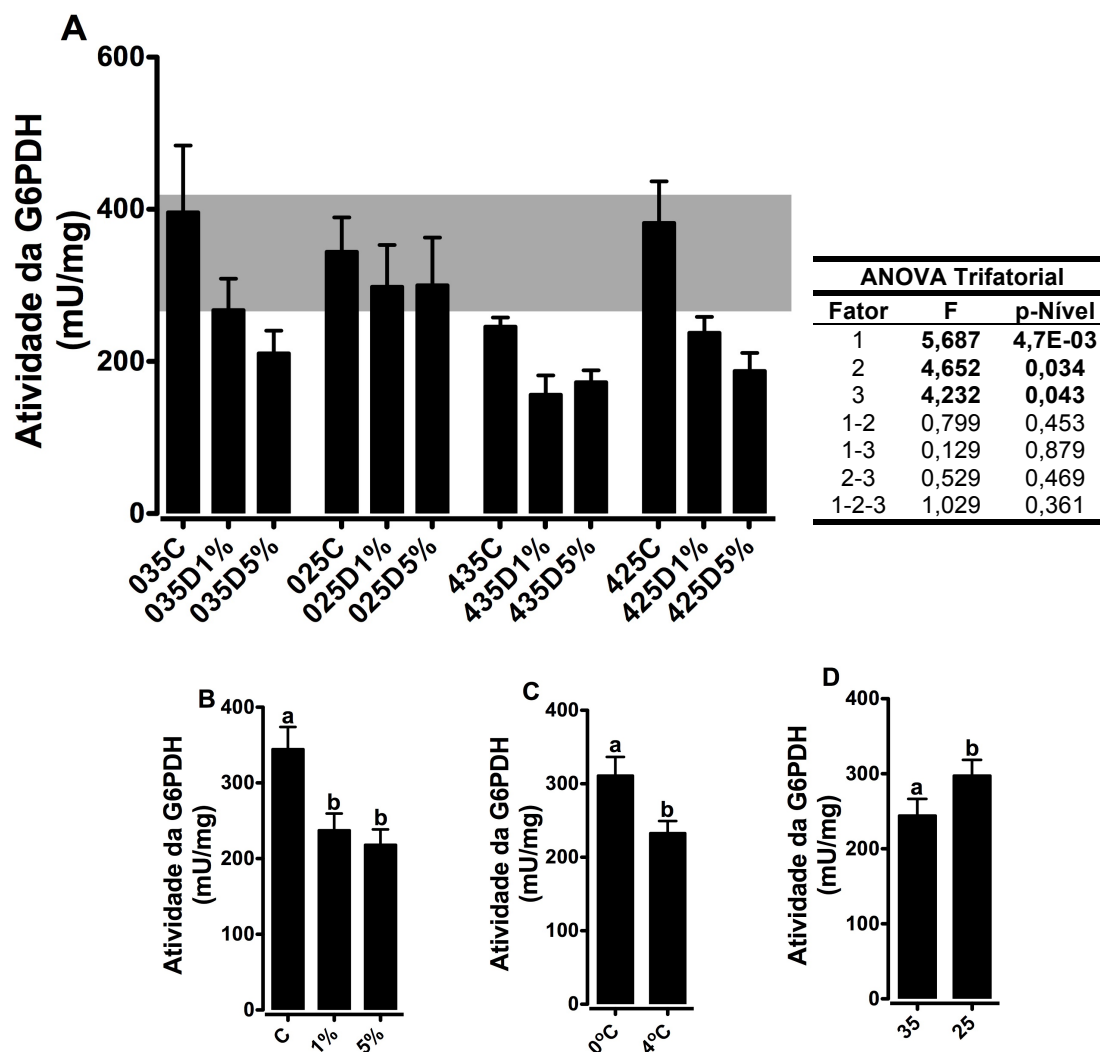


FIGURA 23. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE G6PDH DAS BRÂNKUIAS DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE G6PDH DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); EFEITO DO DIESEL (B); DE TEMPERATURA (C); E SALINIDADE (D) SOBRE OS NÍVEIS DE G6PDH. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

Os níveis brânquias de HK não foram afetados pela presença de óleo diesel, bem como em relação a variação de salinidade. O aquecimento em 4°C foi capaz de reduzir levemente os níveis de HK. Para avaliar o efeito da temperatura apontado na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados de acordo com a condição térmica

(0 e 4°C), sem considerar a presença ou ausência de diesel, e a salinidade (FIGURA 24B). Os resultados estão sumarizados na figura 24.

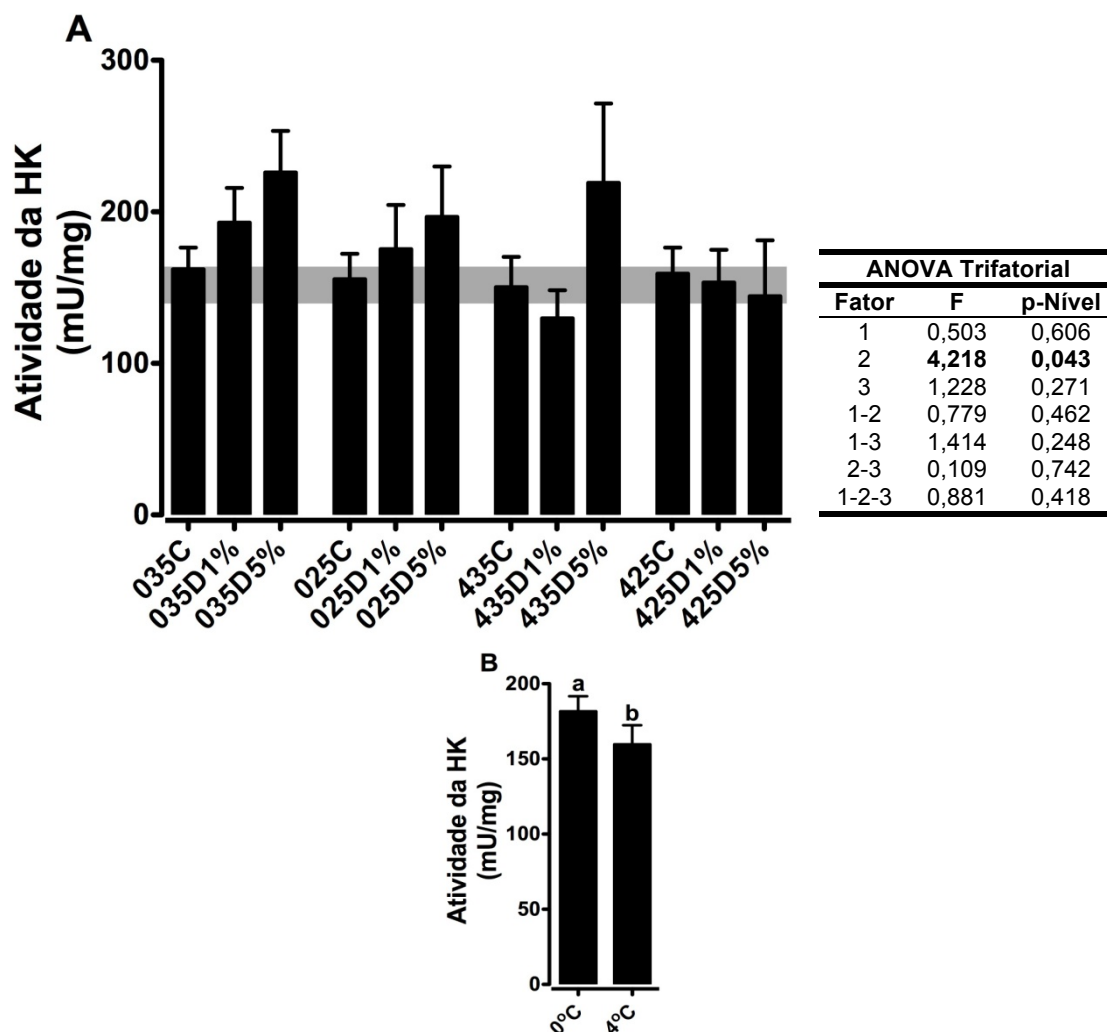


FIGURA 24. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE HK DAS BRÂNQUIAS DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE HK DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); E EFEITO DE TEMPERATURA (B) SOBRE OS NÍVEIS DE HK. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

Os níveis de PFK das brânquias não foram significativamente afetados pela temperatura e nem pelo tratamento com diesel, mesmo nos animais expostos à maior dose. A salinidade de 25psu modulou positivamente os níveis de PFK branquial comparado à salinidade de 35psu. As interações termo-salina e termo-diesel ficaram bem evidente na condição termo-salina 4-25, na qual a PFK apresentou a sua maior atividade. Para avaliar os efeitos das interações termo-salina e termo-diesel apontadas na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados. Para verificar a interação termo-diesel, os resultados foram agrupados em controle, diesel 1% e diesel 5% de acordo com a condição térmica (0 e 4°C), sem considerar a salinidade (FIGURA 25B). Já para verificar a interação

temperatura-salinidade, os resultados foram agrupados de acordo com a condição termo-salina, sem considerar a presença ou ausência de diesel (FIGURA 25C). A existência da interação termo-salina inviabilizou o agrupamento dos dados para avaliação do efeito de salinidade isoladamente. Os resultados estão sumarizados na figura 25.

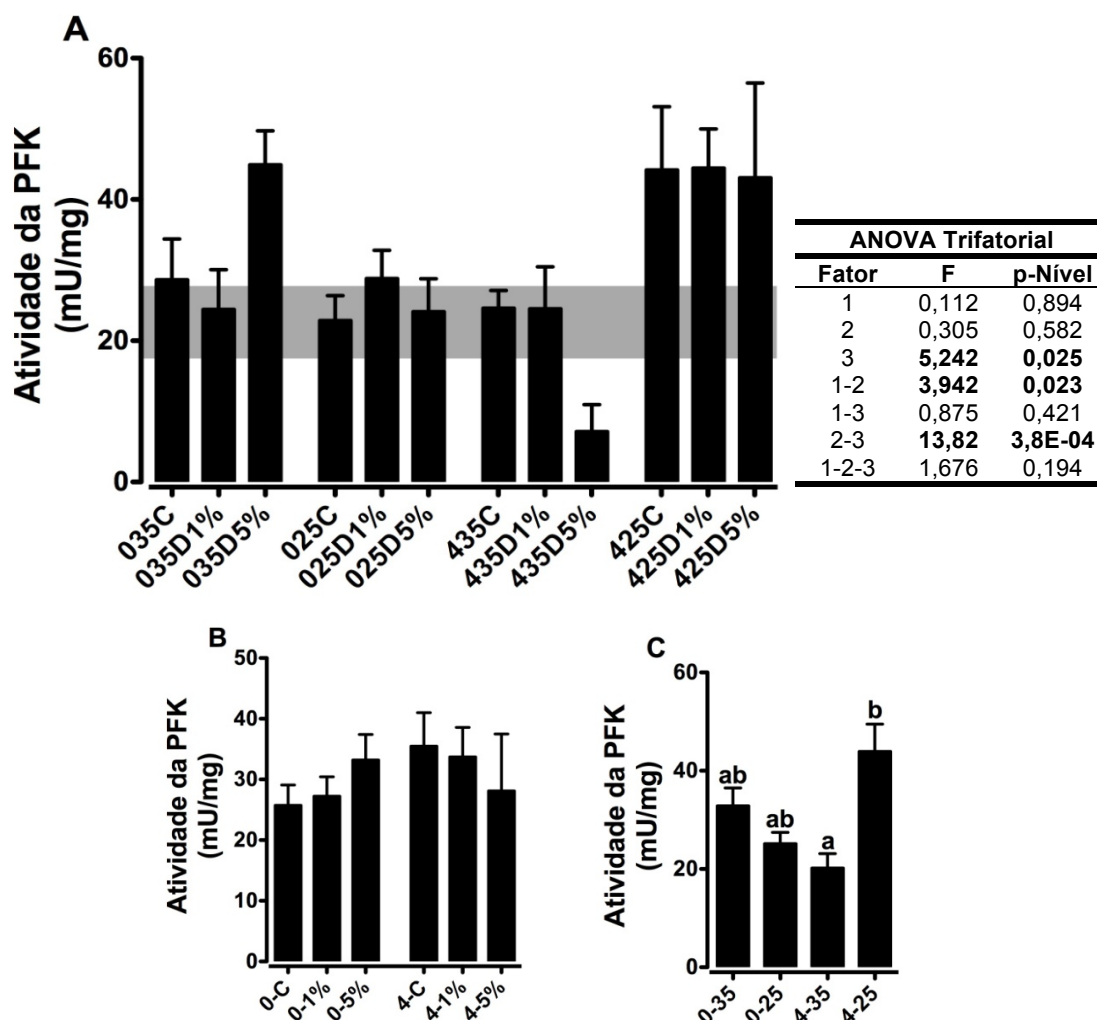


FIGURA 25. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE PFK DAS BRÂNKIAS DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE PFK DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); INTERAÇÃO DIESEL-TEMPERATURA (B); E INTERAÇÃO TERMO-SALINA (C) SOBRE OS NÍVEIS DE PFK. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

Apesar de não significativo, a exposição de *N. concinna* ao diesel foi capaz de causar uma tendência ao decréscimo dos níveis branquiais de LDH, com $p=0,05$. Foi observada uma forte interação termo-salina capaz de modular os níveis de LDH, com redução dos níveis dessa enzima resultante do aumento de temperatura para 4°C com a diminuição da salinidade para 25. Para avaliar os efeitos da interação temperatura-salinidade apontada na ANOVA trifatorial, os resultados foram

agrupados de acordo com a condição termo-salina, sem considerar a presença ou ausência de diesel (FIGURA 26B). O resultados estão sumarizados na figura 26.

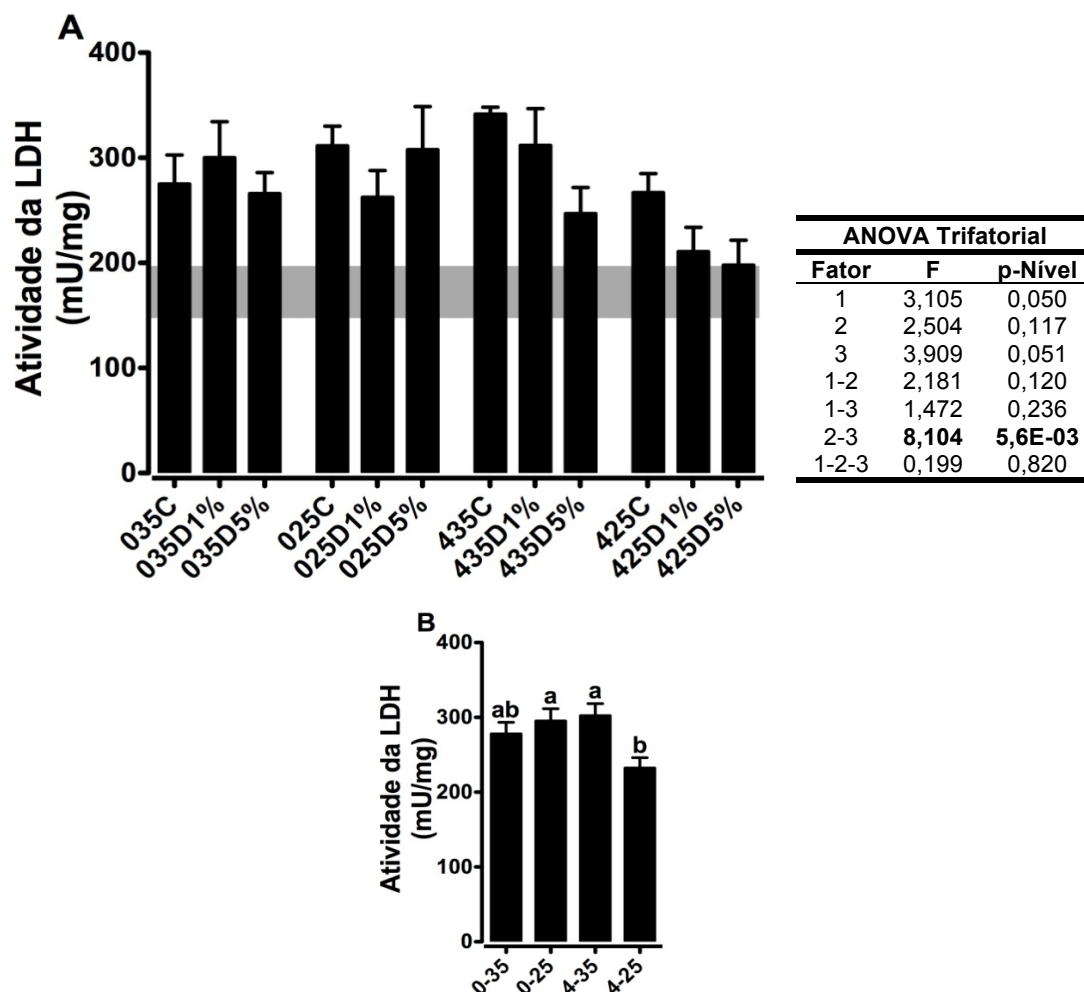


FIGURA 26. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE LDH DAS BRÂNKIAS DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS, COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE LDH DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); E INTERAÇÃO TERMO-SALINA (B) SOBRE OS NÍVEIS DE LDH. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

A salinidade em 25 e o tratamento com óleo diesel não foram capazes de alterar os níveis branquiais de CS. Contudo, o aquecimento em 4°C resultou em redução dos níveis de CS branquial. Uma leve interação óleo-salina foi observada na salinidade em 25. Nesse caso, os níveis de CS foram mantidos em valores mais elevados na presença óleo diesel 1%, comparado aos da salinidade em 35. Para avaliar os efeitos da temperatura e da interação diesel-salina apontados na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados. Para avaliar o efeito da temperatura, os resultados foram agrupados de acordo com a condição térmica (0 e 4°C), sem considerar a presença ou ausência de diesel, e a salinidade (FIGURA 27B). Já para avaliar o efeito da interação diesel-salina, os resultados foram agrupados em

controle, diesel 1% e 5% de acordo com a condição salina (35 e 25 psu), sem considerar a temperatura (FIGURA 27C). Os resultados estão sumarizados na figura 27.

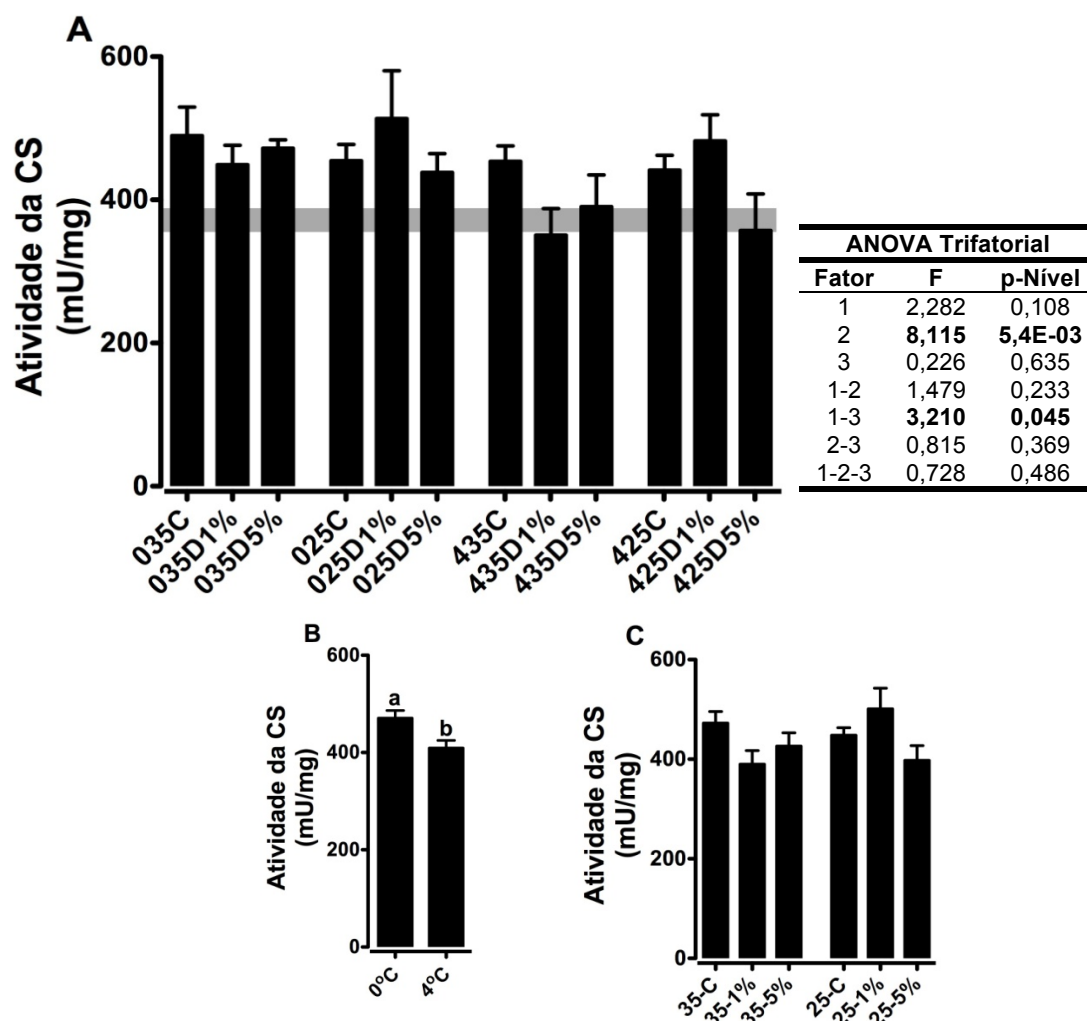


FIGURA 27. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE CS DAS BRÂNKUIAS DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE CS DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); EFEITO DE TEMPERATURA (B); E INTERAÇÃO DIESEL-SALINIDADE (C) SOBRE OS NÍVEIS DE CS. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

Os níveis de MDH branquial não foram significativamente afetados pela variação de temperatura e salinidade, bem como pela exposição dos moluscos ao diesel, independentemente da dose. Também não foram observadas interações de fatores capazes de gerar mudanças significativas dos níveis de MDH branquial. Os resultados estão sumarizados na figura 28.

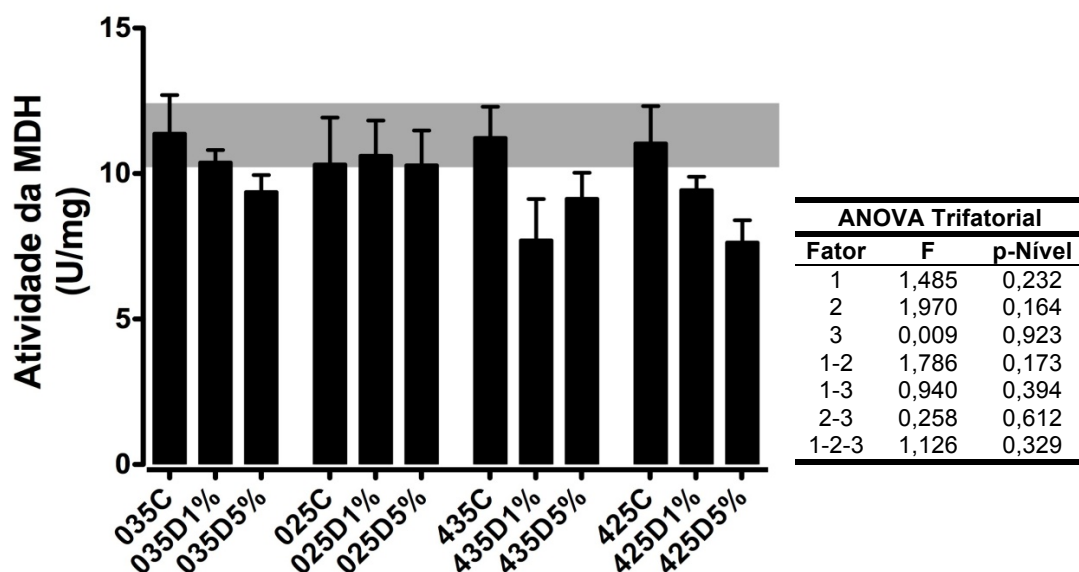


FIGURA 28. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE MDH DAS BRÂNKIAS DE *Nacella concinna*. O GRÁFICO MOSTRA TODOS OS FATORES ASSOCIADOS, COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE MDH DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA). A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

Embora não tenha sido significativo, os níveis branquiais de ARG tenderam a aumentar na presença de óleo diesel na condição termo-salina 0-35, sendo esse efeito dose-dependente. O aquecimento em 4°C foi capaz de reduzir levemente os níveis de ARG. A presença de óleo diesel e a baixa salinidade não foram capazes de modular os níveis de ARG isoladamente. Contudo, ficaram evidentes duas fortes interações entre os fatores, sendo uma termo-salina e a outra diesel-salinidade. Em ambos os casos, a redução da salinidade e o aumento da temperatura foram capazes de evitar o efeito do óleo diesel sobre os níveis de arginase (FIGURA 29). Para avaliar os efeitos das interações diesel-salina e termo-salina apontadas na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados. Para avaliar o efeito da interação diesel-salina, os resultados foram agrupados em controle, diesel 1% e 5%, de acordo com a condição salina (35 e 25 psu), sem considerar a temperatura (FIGURA 29B). Já para avaliar os efeitos da interação temperatura-salinidade, os resultados foram agrupados de acordo com a condição termo-salina, sem considerar a presença ou ausência de diesel (FIGURA 29C). A existência da interação termo-salina inviabilizou o agrupamento dos dados para avaliação do efeito de temperatura isoladamente. Na tabela 3, estão sumarizados todos os resultados obtidos nas brânquias de *N. concinna* no presente estudo.

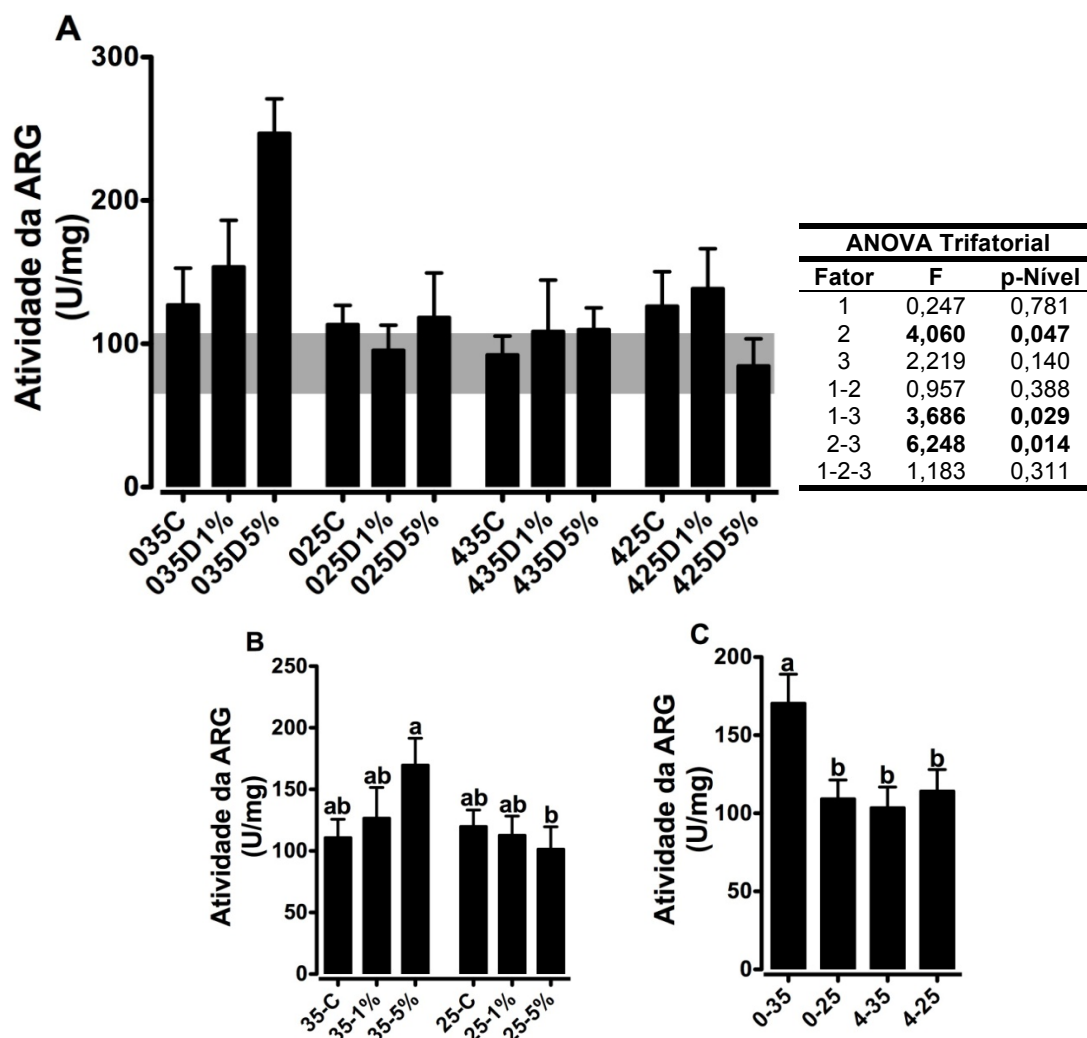


FIGURA 29. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE ARG DAS BRÂNKUIAS DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE ARG DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); INTERAÇÃO DIESEL-SALINIDADE (B); E INTERAÇÃO TERMO-SALINA (C) SOBRE OS NÍVEIS DE ARG. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

TABELA 3. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS DOS PARÂMETROS ANALISADOS NAS BRÂNQUIAS DE *Nacella concinna*. (↑) E (↓) INDICAM AUMENTO E DIMINUIÇÃO NOS NÍVEIS DOSADOS, RESPECTIVAMENTE; (★) INDICA EXISTÊNCIA DE INTERAÇÕES; (-) INDICA QUE NÃO FORAM VERIFICADAS ALTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS DOS NÍVEIS DOSADOS; OS NÚMEROS REPRESENTAM OS FATORES AVALIADOS, SENDO DIESEL (1), AQUECIMENTO EM 4°C (2) E BAIXA SALINIDADE EM 25psu (3).

Brânquias – ANOVA Trifatorial							
Parâmetros	Fatores Isolados			Interações			
	1	2	3	1-2	1-3	2-3	1-2-3
GR	↑	–	–	–	–	–	–
SOD	–	↑	↑	–	–	–	–
CAT	↓	↓	–	–	–	–	–
G6PDH	↓	↓	↑	–	–	–	–
HK	–	↓	–	–	–	–	–
PFK	–	–	↑	★	–	★	–
LDH	–	–	–	–	–	★	–
CS	–	↓	–	–	★	–	–
MDH	–	–	–	–	–	–	–
ARG	–	↓	–	–	★	★	–

FONTE: O AUTOR (2013).

5.4. Pé Muscular

A exposição ao óleo diesel modulou negativamente os níveis de SOD no pé muscular de *N. concinna*. Esse efeito foi dose-dependente e presente de forma evidente nas condições termo-salinas 0-25 e 4-35. A temperatura também foi capaz de modular os níveis musculares de SOD, proporcionando um leve aumento de atividade no aquecimento em 4°C. A salinidade também foi capaz de modular positivamente os níveis de SOD com valores mais elevados na salinidade em 25 do que em 35. Uma leve interação entre esses três fatores também foi observada. O efeito modulador negativo do diesel sobre os níveis da SOD observado na condição termo-salina 0-25, não ficou evidente nas condições termo-salinas 4-35 e 4-25. A existência da interação termo-salina-diesel inviabilizou o agrupamento dos dados para avaliação do efeito de diesel, temperatura e salinidade isoladamente. Os resultados estão sumarizados na figura 30.

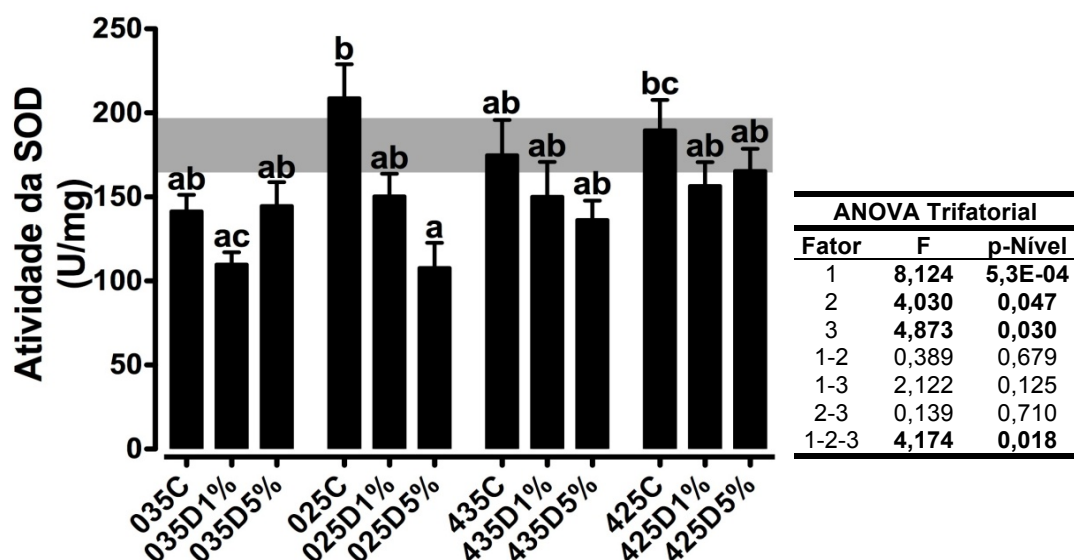


FIGURA 30. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE SOD DO PÉ MUSCULAR DE *Nacella concinna*. O GRÁFICO MOSTRA TODOS OS FATORES ASSOCIADOS COM O RESULTADO DA INTERAÇÃO ENTRE DIESEL, TEMPERATURA E SALINIDADE (A), E OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE SOD DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA). A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

O óleo diesel foi capaz de modular positivamente os níveis de CAT no pé muscular. Esse efeito foi dose-dependente somente nas condições termo-salinas 0-35 e 4-25. Por outro lado, o aquecimento em 4°C e a baixa salinidade não foram capazes de modular a atividade da CAT. Também não foram observadas interações entre diesel, temperatura e salinidade, capazes de modular os níveis dessa enzima. Para avaliar o efeito do diesel apontado na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados em controle, diesel 1% e diesel 5% independentemente da condição termo-salina (FIGURA 31B). Os resultados estão sumarizados na figura 31.

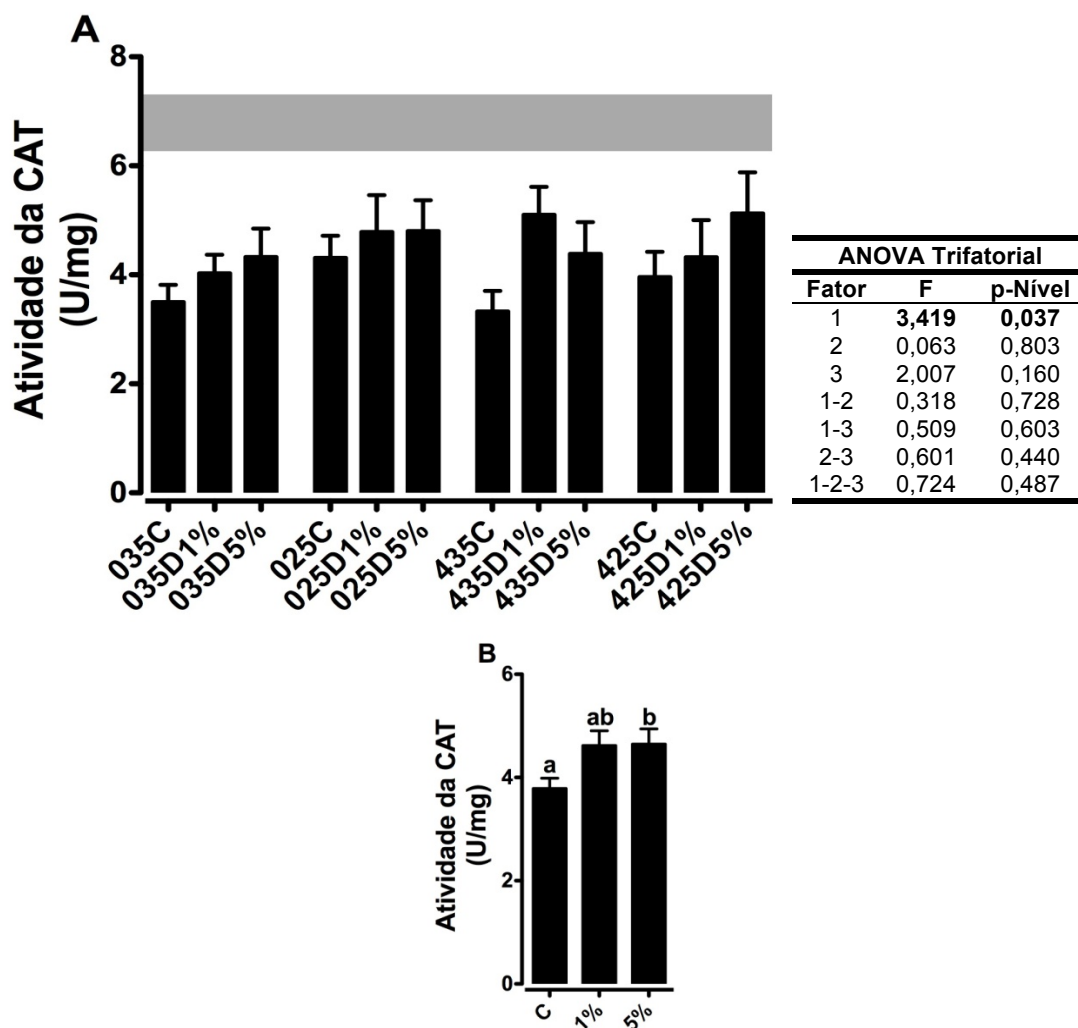


FIGURA 31. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE CAT DO PÉ MUSCULAR DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE CAT DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); E EFEITO DO DIESEL (B) SOBRE OS NÍVEIS DE CAT. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

Os níveis musculares de G6PDH foram fortemente modulados para baixo na presença de óleo diesel. Esse comportamento ficou evidente em todas as condições termo-salinas, embora uma leve interação termo-salina em 4°C tenha proporcionado níveis um pouco mais elevados de G6PDH no tecido muscular. O aquecimento em 4°C não foi capaz de alterar expressivamente os níveis de G6PDH no pé muscular, mas a tendência de níveis mais baixo ficou evidente na salinidade em 35. Na baixa salinidade os níveis enzimáticos foram mais elevados. Embora o efeito do diesel tenha ficado muito evidente, também foi possível observar uma leve interação termo-salina-diesel capaz de modular positivamente os níveis dessa enzima. A existência da interação termo-salina-diesel inviabilizou o agrupamento dos dados para avaliação do efeito de diesel e salinidade isoladamente, bem como o efeito da interação termo-salina. Os resultados estão sumarizados na figura 32.

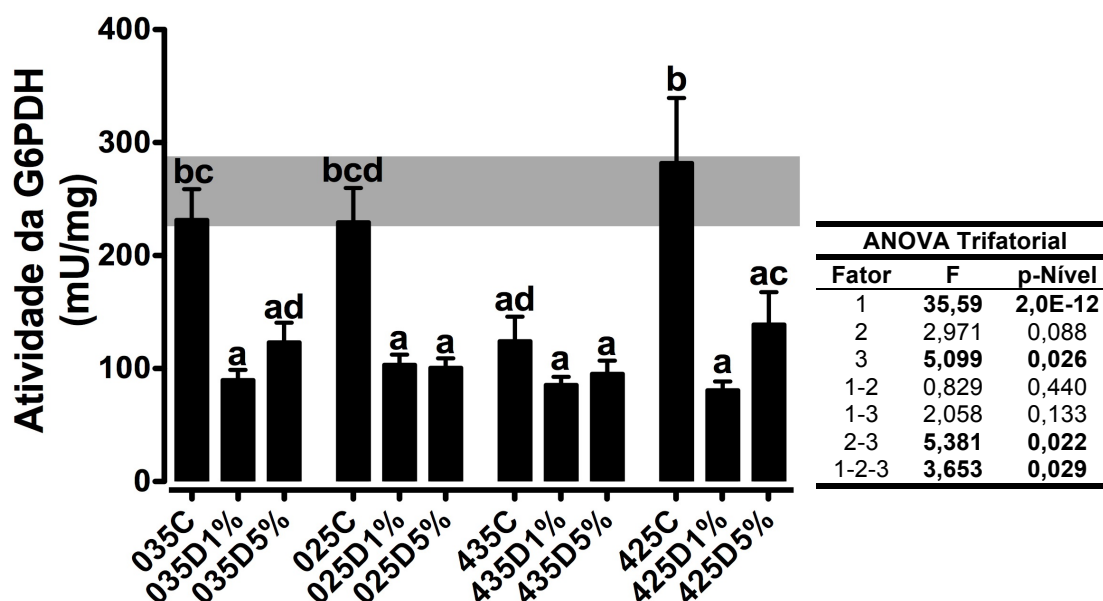


FIGURA 32. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE G6PDH DO PÉ MUSCULAR DE *Nacella concinna*. O GRÁFICO MOSTRA TODOS OS FATORES ASSOCIADOS COM O RESULTADO DA INTERAÇÃO ENTRE DIESEL, TEMPERATURA E SALINIDADE (A), E OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE G6PDH DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA). A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

Os níveis musculares de HK também foram fortemente modulados na presença de óleo diesel. O aumento da atividade de HK foi dose-dependente e observado somente nas condições termo-salinas 0-25 e 4-25. O aquecimento em 4°C e a baixa salinidade não foram capazes de modular os níveis de HK muscular. Também não foram observado qualquer tipo de interação entre esses fatores. Para avaliar o efeito do diesel apontado na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados em controle, diesel 1% e diesel 5% independentemente da condição termo-salina (FIGURA 33B). Os resultados estão sumarizados na figura 33.

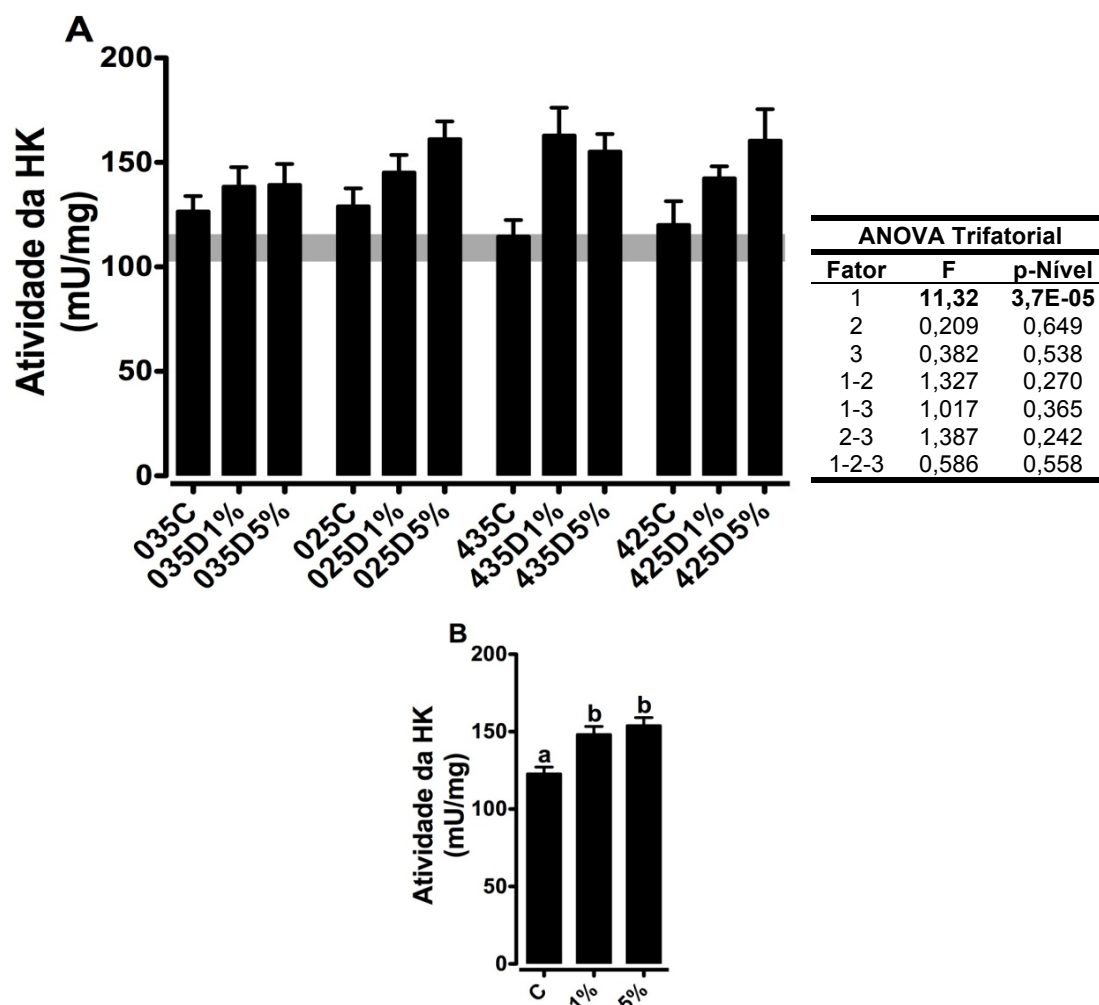


FIGURA 33. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE HK DO PÉ MUSCULAR DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE HK DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); E EFEITO DO DIESEL (B) SOBRE OS NÍVEIS DE HK. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

O aquecimento em 4°C foi capaz de modular negativamente os níveis musculares de PFK. Esse efeito ficou evidente na forte interação termo-diesel em 4°C, capaz de modular negativamente os níveis de PFK na presença de óleo diesel. Uma leve interação termo-salina-diesel também foi observada, na qual os níveis de PFK com tendência de valores mais elevados na baixa salinidade em 0°C, foram influenciados negativamente no aquecimento em 4°C. Como a ANOVA trifatorial apontou uma interação termo-diesel mais forte ($p < 0,001$) do que a interação termo-salina-diesel ($p = 0,022$) capaz de modular os níveis de PFK, os resultados foram agrupados em controle, diesel 1% e diesel 5% de acordo com a condição térmica (0 e 4°C), sem considerar a salinidade (FIGURA 34B). A existência das interações termo-diesel e termo-salina-diesel inviabilizou o agrupamento dos dados para

avaliação do efeito de temperatura isoladamente. Os resultados estão sumarizados na figura 34.

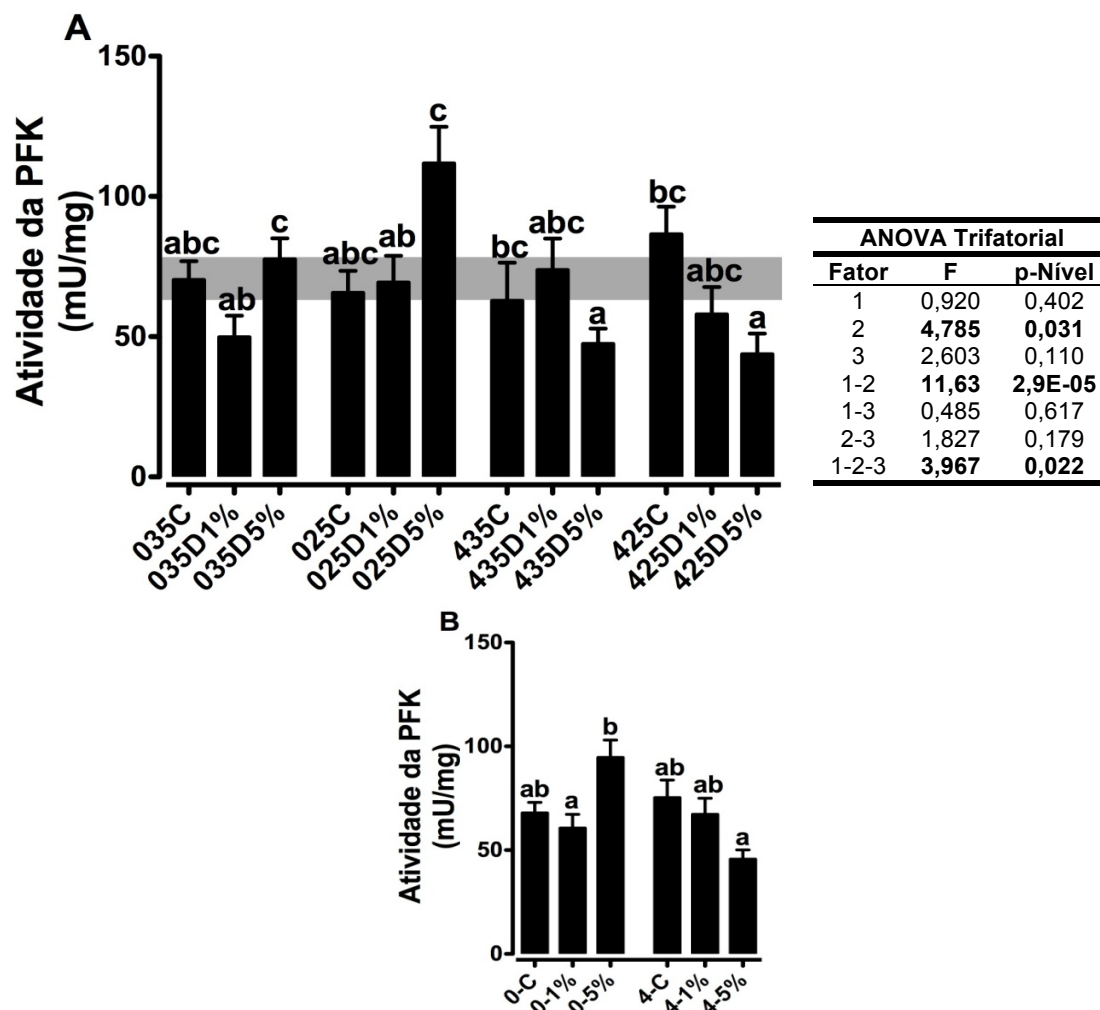


FIGURA 34. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE PFK DO PÉ MUSCULAR DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS COM O RESULTADO DA INTERAÇÃO ENTRE DIESEL, TEMPERATURA E SALINIDADE (A), E OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE PFK DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); E A INTERAÇÃO DIESEL-TEMPERATURA (B) SOBRE OS NÍVEIS DE PFK. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

Os níveis de LDH muscular não foram significativamente modulados pela ação isolada de temperatura, salinidade e diesel. Contudo, uma forte interação termo-salina foi verificada. A salinidade em 25 e o aquecimento em 4°C isoladamente, tenderam a elevar os níveis dessa enzima, mas a interação entre o aquecimento e a baixa salinidade resultaram em níveis menores de LDH. Para avaliar o efeito da interação temperatura-salinidade apontada na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados de acordo com a condição termo-salina, sem considerar a presença ou ausência de diesel (FIGURA 35B). Os resultados estão sumarizados na figura 35.

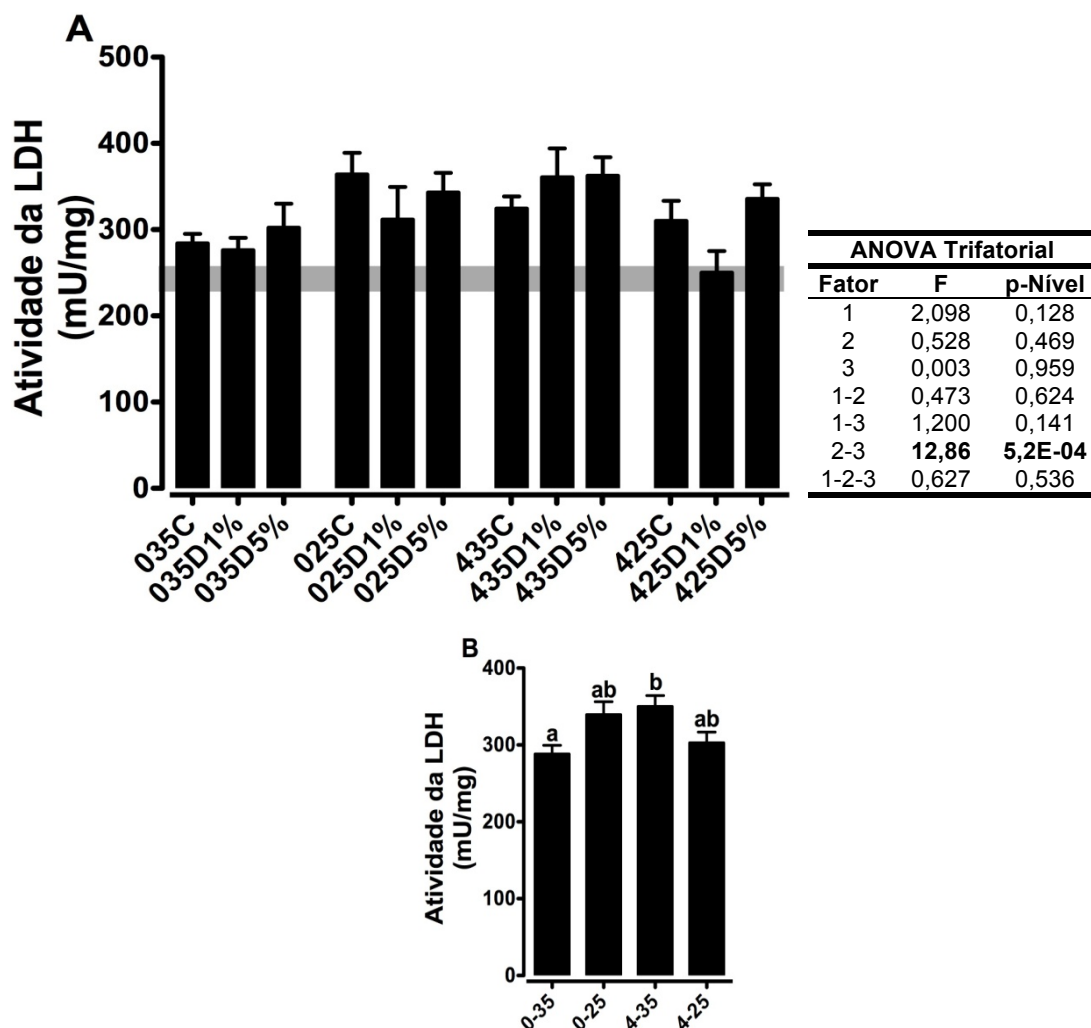


FIGURA 35. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE LDH DO PÉ MUSCULAR DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE LDH DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); E EFEITO DA INTERAÇÃO TERMO-SALINA (B) SOBRE OS NÍVEIS DE LDH. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

O aquecimento em 4°C, a redução da salinidade e a presença de óleo diesel não foram capazes de modular individualmente os níveis musculares da enzima CS. Contudo, foi observada uma forte interação diesel-salina capaz de modular negativamente os níveis da CS na salinidade de 25. Esse efeito ficou mais evidente na condição termo-salina 0-25. Para avaliar os efeitos da interação diesel-salina apontada na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados em controle, diesel 1% e 5% de acordo com a condição salina (35 e 25 psu), sem considerar a temperatura (FIGURA 36B). Os resultados encontram-se sumarizados na figura 36.

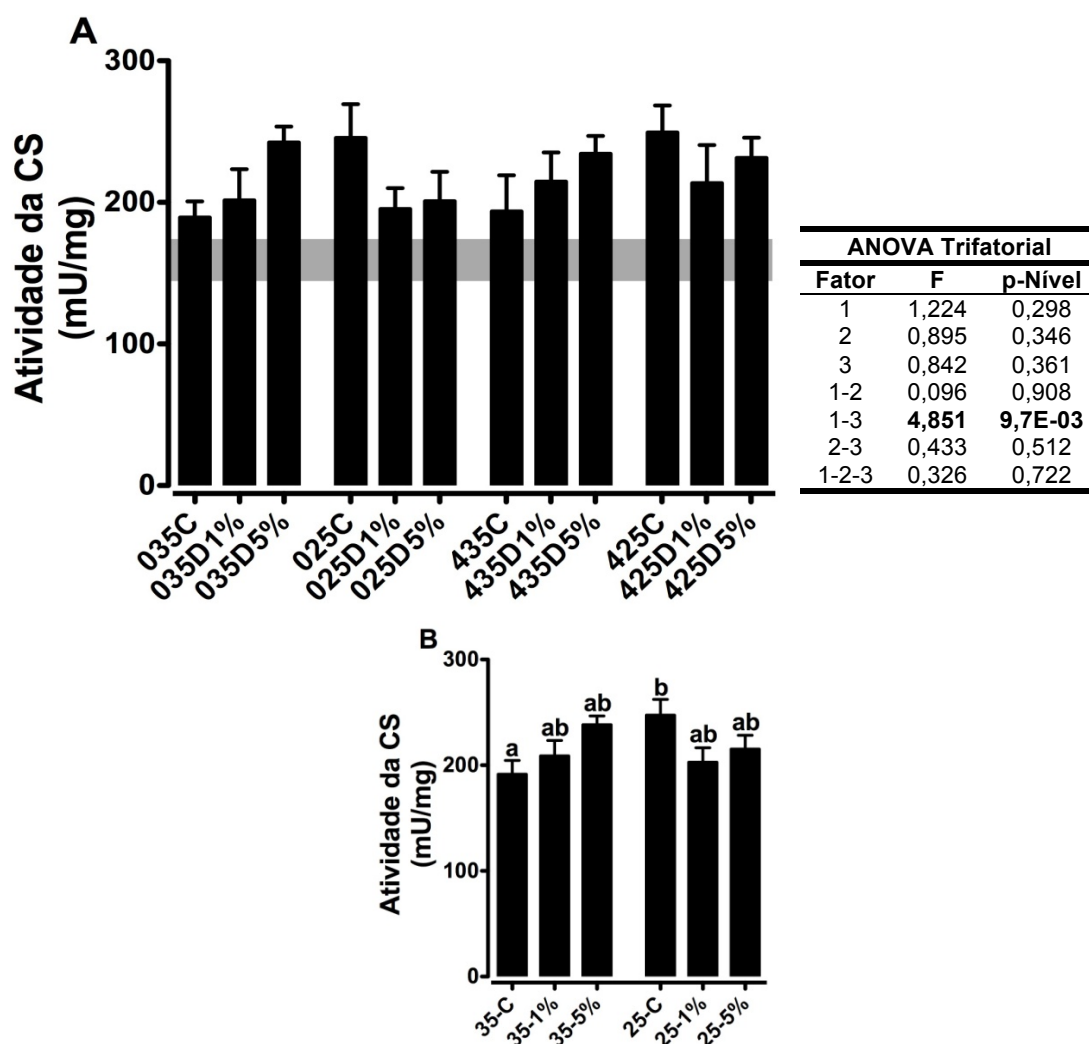


FIGURA 36. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE CS DO PÉ MUSCULAR DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE CS DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); E EFEITO DA INTERAÇÃO DIESEL-SALINIDADE (B) SOBRE OS NÍVEIS DE CS. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

Os níveis de MDH muscular não foram significativamente modulados pela ação isolada dos três fatores estudados. Contudo, uma forte interação termo-salina revelou que a salinidade em 25 e o aquecimento em 4°C tenderam a elevar os níveis dessa enzima, mas a interação entre o aquecimento e a baixa salinidade resultaram em valores de atividade menores, visualizado em 4-25. Para avaliar o efeito da interação temperatura-salinidade apontada na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados de acordo com a condição termo-salina, sem considerar a presença ou ausência de diesel (FIGURA 37B). Os resultados estão sumarizados na figura 37.

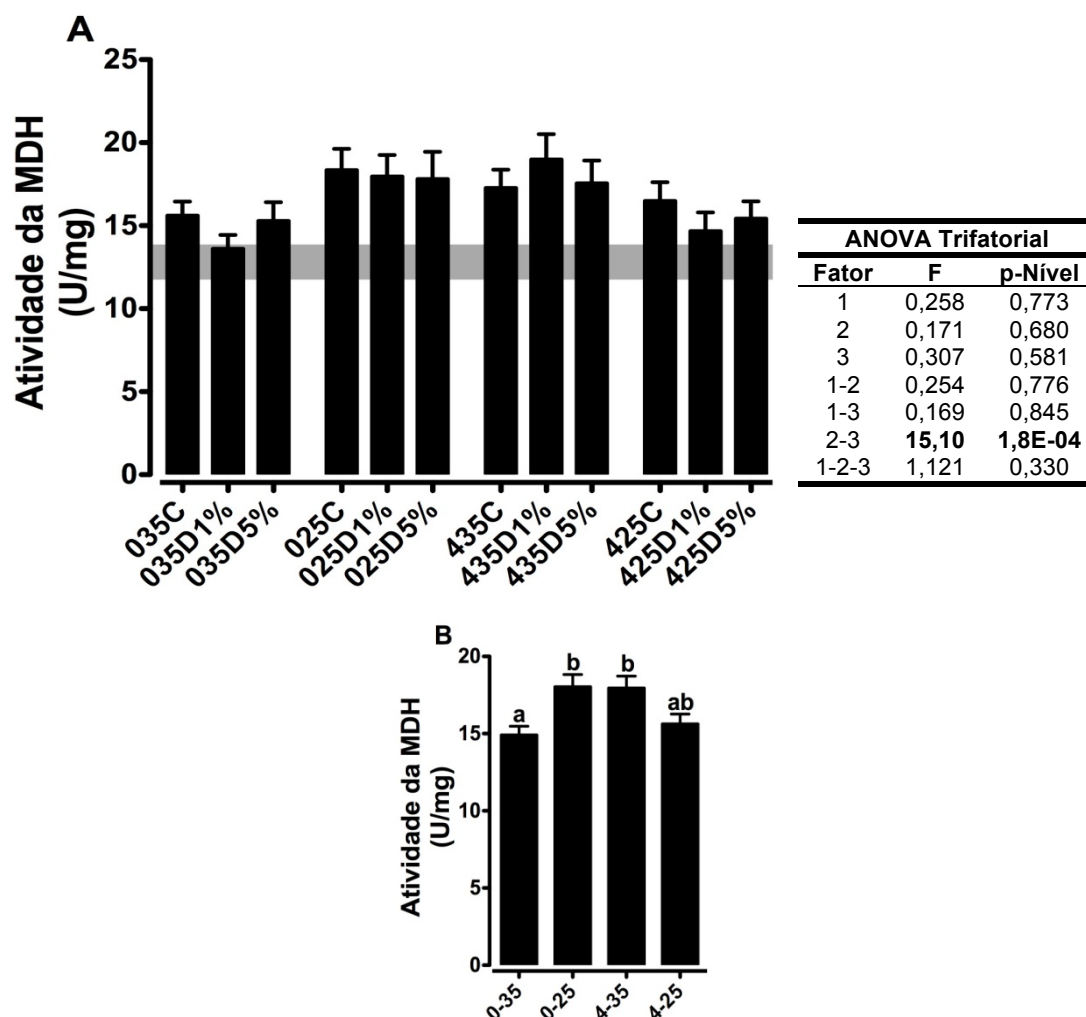


FIGURA 37. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE MDH DO PÉ MUSCULAR DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE MDH DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); E EFEITO DA INTERAÇÃO TERMO-SALINA (B) SOBRE OS NÍVEIS DE MDH. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

Os níveis de ARG muscular foram menores na presença de óleo diesel. Esse efeito ficou mais evidente nas condições termo-salinas 0-25 e 4-25, sendo dose-dependente. O aquecimento em 4°C e a baixa salinidade não foram capazes de modular a atividade da ARG, nem isoladamente ou mediante interação com os outros fatores. Para avaliar o efeito do diesel apontado na ANOVA trifatorial, os resultados foram agrupados em controle, diesel 1% e diesel 5% independentemente da condição termo-salina (FIGURA 38B). Os resultados estão sumarizados na figura 38. Na tabela 4, estão sumarizados todos os resultados obtidos no pé muscular de *N. concinna* no presente estudo.

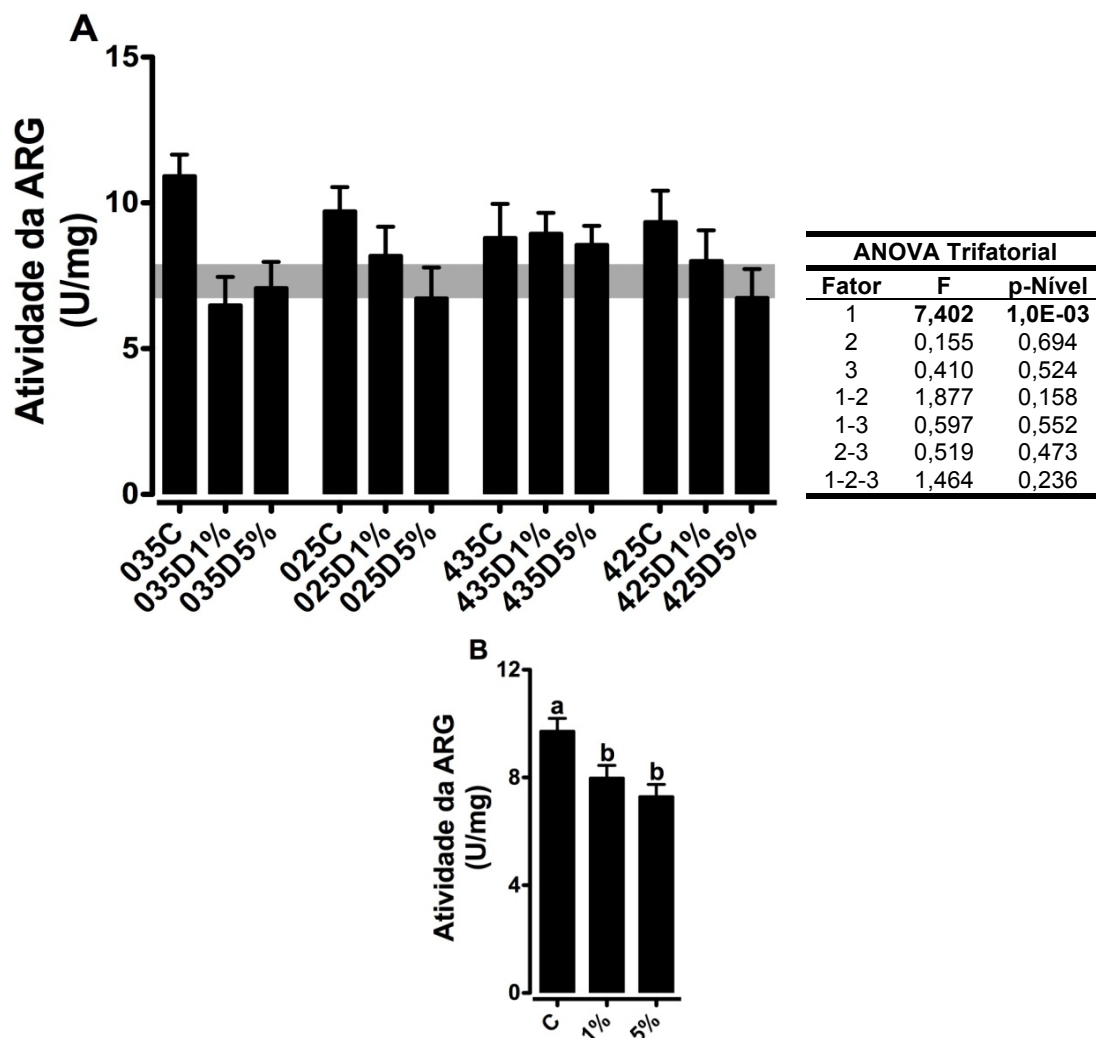


FIGURA 38. EFEITO DO ÓLEO DIESEL SOBRE OS NÍVEIS DE ARG DO PÉ MUSCULAR DE *Nacella concinna*. OS GRÁFICOS MOSTRAM TODOS OS FATORES ASSOCIADOS (A), COM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO DE ARG DO REFERENCIAL DA NATUREZA (FAIXA CINZA); E EFEITO DO DIESEL (B) SOBRE OS NÍVEIS DE ARG. A TABELA SUMARIZA OS RESULTADOS DA ANOVA TRIFATORIAL, SENDO DIESEL (1), TEMPERATURA (2) E SALINIDADE (3). LETRAS DISTINTAS INDICAM RESULTADOS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $p < 0,05$. FONTE: O AUTOR (2013).

TABELA 4. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS PARÂMETROS ANALISADOS NO PÉ MUSCULAR DE *Nacella concinna*. (↑) E (↓) INDICAM AUMENTO E DIMINUIÇÃO NOS NÍVEIS DOSADOS, RESPECTIVAMENTE; (★) INDICA EXISTÊNCIA DE INTERAÇÕES; (-) INDICA QUE NÃO FORAM VERIFICADAS ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DOSADOS; OS NÚMEROS REPRESENTAM OS FATORES AVALIADOS, SENDO DIESEL (1), AQUECIMENTO EM 4°C (2) E BAIXA SALINIDADE EM 25psu (3).

Pé Muscular – ANOVA Trifatorial							
Parâmetros	Fatores Isolados			Interações			
	1	2	3	1-2	1-3	2-3	1-2-3
SOD	↓	↑	↑	–	–	–	★
CAT	↑	–	–	–	–	–	–
G6PDH	↓	–	↑	–	–	★	★
HK	↑	–	–	–	–	–	–
PFK	–	↓	–	★	–	–	★
LDH	–	–	–	–	–	★	–
CS	–	–	–	–	★	–	–
MDH	–	–	–	–	–	★	–
ARG	↓	–	–	–	–	–	–

FONTE: O AUTOR (2013).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo foi conduzido com animais expostos ao diesel em quatro condições termo-salinas distintas. O efeito debilitante desse óleo combustível sobre a resposta ao estímulo mecânico do pé muscular de *N. concinna* ficou mais evidente nas condições termo-salinas 0-35 e 4-25, comparado com os gastrópodes das condições termo-salinas 0-25 e 4-35. Esse resultado, aparentemente inesperado, pode ser explicado considerando um possível efeito hormético (CALABRESE, 2002; 2005), no qual pequenas doses de estresse, causadas pela variação de salinidade e temperatura, isoladamente, poderiam estar aumentando a capacidade de aclimação de *N. concinna* e reduzindo o número de lesões num primeiro momento. Nesse caso, a medida que o estresse aumentou com a exposição ao óleo diesel, a capacidade de aclimação de *N. concinna* também se elevou até um certo limite, a partir do qual a morte de alguns indivíduos sobreveio.

A condição termo-salina 0-35 foi admitida como a condição mais próxima do ambiente natural de *N. concinna* nos períodos de imersão e, conseqüentemente, como a condição experimental de menor estresse. Assim, o efeito do diesel pode ter sido mais lesivo para os patelídeos aclimatados em 0-35 do que para aqueles aclimatados nas condições termo-salinas 0-25 e 4-35, nas quais as pequenas doses de estresse da salinidade em 25 e o aquecimento em 4°C, podem ter induzido respostas prévias de defesa. Já em 4-25, a dose de estresse inicial pode ter sido suficientemente acentuada para dificultar a aclimação dos patelídeos ao diesel. A hipótese de uma provável resposta hormética em *N. concinna* não está comprovada e o assunto permanece em discussão.

6.1. Defesa Antioxidante

6.1.1. Controle Experimental vs Referencial da Natureza

Os níveis de SOD e CAT no tecido muscular e SOD no tecido branquial de *N. concinna* se apresentaram mais elevados no grupo referência da natureza em relação ao controle experimental. Embora os níveis branquiais de CAT tenham sido estatisticamente iguais nos dois grupos, ficou evidente os níveis mais elevados de CAT no referencial da natureza em relação ao controle experimental.

Diferenças como essas foram atribuídas ao ciclo circadiano desse gastrópode na zona entre marés e a manutenção das suas necessidades inerentes à defesa antioxidante (ANSALDO *et al.*, 2005). Durante a baixa mar, o gastrópode *N. concinna* fica exposto ao clima do ambiente terrestre e convive com amplas variações de temperatura e eventuais flutuações de salinidade decorrente do aporte das águas de degelo na zona entre marés.

Nesse sentido, o tecido branquial tem sido considerado o principal alvo de danos oxidativos decorrentes da exposição aos níveis elevados de oxigênio do ambiente terrestre, durante a exposição aérea (MALANGA *et al.*, 2005). A aproximação da concha ao substrato, com o objetivo de evitar perda d'água e reduzir o contato direto com o oxigênio favorece a hipóxia, que é seguida de re-oxigenação rápida em função dos ciclos de marés (WEIHE *et al.*, 2010). Acredita-se que durante a exposição aérea, o oxigênio também é capturado pela superfície do pé muscular de *N. concinna*. Assim, espera-se que as brânquias e o pé muscular desse gastrópode possuam uma defesa antioxidante eficaz, com níveis elevados de enzimas antioxidantes (WEIHE *et al.*, 2010).

Os níveis mais baixos de SOD na glândula digestiva de *N. concinna* do grupo referência da natureza em relação aos do controle experimental podem estar relacionados com a condição alimentar desse gastrópode. Ansaldo e colaboradores (2007) constataram que os níveis de SOD e CAT na glândula digestiva aumentam ao longo do jejum. Embora no presente estudo não tenha sido observado aumento de CAT visceral, o aumento de SOD na glândula digestiva do controle experimental comparado ao referencial da natureza pode estar relacionado com o fato de os animais terem sido mantidos em jejum durante o período experimental.

Dessa forma, os níveis de algumas enzimas da defesa antioxidante do controle experimental divergiram da referência da natureza, revelando que a condição termo-salina estável do controle experimental foi capaz de modular a defesa antioxidante de *N. concinna* de maneira distinta da condição ambiental nativa desse gastrópode, imposta pelo ciclo de marés e águas de degelo.

6.1.2. Efeito do diesel, temperatura e salinidade sobre a defesa antioxidante e marcadores de lesões oxidativas

A exposição ao óleo diesel, ao aquecimento em 4°C e a baixa salinidade, resultaram em respostas antioxidantes distintas nos três tecidos estudados. Os níveis elevados de GR e SOD da glândula digestiva de *N. concinna* exposta ao óleo diesel revelaram que esse tecido é capaz de modular positivamente o seu potencial antioxidante. A SOD converte o anion radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) em água oxigenada (H_2O_2) e oxigênio molecular. A água oxigenada tem se mostrado menos reativa do que outros ROS e pode ser decomposta em H_2O e oxigênio molecular pela catalase. Essa reação previne a redução da água oxigenada em radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), um dos mais potentes agentes oxidantes, o qual é formado na presença de traços de metais, como ferro e cobre, pela reação de Fenton. Quando a velocidade de formação de ROS supera a sua velocidade de decomposição, um excesso celular

de ROS se estabelece e as lesões oxidativas em proteínas e lipídeos tornam-se evidentes (NAGAMI *et al.*, 2005; PAN *et al.*, 2006; WEIHE, 2009).

Por outro lado, o efeito potencialmente tóxico da água oxigenada tem sido associado a sua decomposição em hidroxil ($\bullet\text{OH}$), na presença de traços de metais. A ausência de carga e a baixa massa molecular permitem que esse radical tenha trânsito intracelular livre, podendo oxidar constituintes biológicos nos diversos compartimentos subcelulares, inclusive peroxidar lipídeos insaturados de membranas biológicas (SMITH *et al.*, 2005).

Provavelmente, a ação oxidante direta mais evidente de certos poluentes reside na redução dos níveis de tióis. Nesse sentido, a diminuição da proporção entre glutathiona reduzida e oxidada (GSH:GSSG) tem sido utilizada como indicador do potencial redutor celular, capaz de neutralizar diretamente a ação de radicais livres e ROS, bem como aumentar a atividade de peroxidases. A GR utiliza $\text{NADPH} + \text{H}^+$ como cofator para manter a glutathiona reduzida e, conseqüentemente, eleva a capacidade tamponante redutora das células (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Assim, o aumento dos níveis de GR na glândula digestiva de *N. concinna* exposto ao óleo diesel, representa uma resposta protetora antioxidante. Também foi observada uma leve interação termo-salina em 4-25, capaz de elevar os níveis de GR nesse tecido. Essa é uma condição ambiental possível na zona entre marés da Ilha Rei George, que durante a baixa mar expõe esse patelídeo às temperaturas mais elevadas do ambiente terrestre e à baixa salinidade das águas de degelo.

Por outro lado, Ansaldo *et al.* (2005) analisaram o efeito de diferentes concentrações de fração acomodada de diesel em água (0,05% e 0,1%) sobre os níveis de enzimas da defesa antioxidante da glândula digestiva de *N. concinna*, e constaram que os níveis de SOD permaneceram inalterados em quase todos os experimentos, aumentando somente na maior concentração da fração de diesel acomodada em água (0,1%), após 48 horas de exposição. No entanto, os resultados desses autores divergem em relação aos do presente estudo, onde o óleo diesel foi capaz de alterar significativamente os níveis de SOD na glândula digestiva de *N. concinna*. Essa divergência pode ser decorrente das diferenças metodológicas utilizadas nesses dois estudos. Nesse caso, Ansaldo *et al.* (2005) conduziram os seus experimentos em água do mar em 1°C, sem informar a salinidade exata, utilizaram apenas a fração solúvel do diesel na água do mar em doses inferiores as do presente estudo, bem como determinaram os níveis de SOD em fração subcelular livre de mitocôndrias.

Embora os níveis de CAT na glândula digestiva de *N. concinna* não tenham sido modulados pelo aquecimento em 4°C, baixa salinidade e óleo diesel, esses níveis foram cerca de uma e duas ordens de grandeza maiores do que nas brânquias e pé muscular, respectivamente. Nesse caso, os níveis elevados de CAT na glândula digestiva podem estar atendendo demandas antioxidantes específicas envolvendo a decomposição da H₂O₂. A presença de níveis elevados de ferro e cobre na glândula digestiva, variando entre uma e duas ordens de grandeza acima de músculo e gônadas (AHN *et al.*, 2003), podem estar favorecendo a decomposição da H₂O₂ em radical hidroxil, via reação de Fenton. Assim, os níveis elevados de catalase aparentemente indicam que a glândula digestiva apresenta alto potencial para decompor a água oxigenada e minimizar a formação de radical hidroxil, bem como o seu efeito deletério sobre estruturas celulares.

Os níveis de CAT da glândula digestiva de *N. concinna* não foram modulados pela exposição ao diesel. Estudando *N. concinna*, Ansaldo *et al.* (2005) também constataram que os níveis de CAT da glândula digestiva não foram modulados pela fração acomodada do diesel em água. Contudo, os níveis de CAT registrados no presente estudo foram bem mais elevados do que os descritos por Ansaldo *et al.* (2005), provavelmente devido as diferenças entre as metodologias utilizadas, considerando que esses autores determinaram a atividade da CAT na fração livre de mitocôndrias. Estudando a ostra *Crassostrea rhizophorae*, Zaccaron Da Silva *et al.* (2005) constataram que a exposição ao óleo diesel também não é capaz de modular os níveis de CAT na glândula digestiva desse bivalve. Embora pertencendo a grupos distintos de organismos, as atividades específicas de CAT na glândula digestiva de *N. concinna* e *C. rhizophorae* apresentaram valores dentro da mesma ordem de grandeza.

A modulação dos níveis de GST na glândula digestiva de *N. concinna* pode ser uma resposta protetora a endobióticos formados na aclimação térmica desse patelídeo em 4°C. A GST participa da fase II do metabolismo de xenobióticos e endobióticos conjugando o tripeptídeo glutathione a uma variedade de substratos potencialmente tóxicos (BORKOVIC *et al.*, 2008; JANG *et al.*, 2008). A sua atividade também tem sido associada com a defesa antioxidante de diversos organismos e é capaz de minimizar os danos teciduais causados por aldeídos intracelulares (endobióticos) derivados da peroxidação de DNA e lipídeos, mediante conjugação com glutathione (FERREIRA *et al.*, 2007; VALKO *et al.*, 2007).

O aumento dos níveis de SOD e GST na glândula digestiva desse gastrópode, no aquecimento em 4°C, indica uma resposta protetora antioxidante

induzida pelo aumento de temperatura, embora a interação termo-salina 4-25, tenha sido capaz de modular negativamente os níveis de GST. Entretanto, a incapacidade de modular positivamente os níveis de GST, na exposição ao óleo diesel, sugere que esse gastrópode não consegue induzir adequadamente respostas protetoras de fase II do metabolismo de xenobióticos, mediadas pela GST.

A exposição à hidrocarbonetos normalmente é capaz de induzir níveis mais elevados de GST em tecidos biológicos (HOARAU *et al.*, 2001; CHEUNG *et al.*, 2004; LAVARÍAS *et al.*, 2011; TURJA *et al.*, 2013). Contudo, Ansaldo *et al.* (2005) revelaram que a glândula digestiva de *N. concinna*, exposto à fração acomodada de diesel na água, não foi capaz de modular os níveis de GST. Esse resultado foi semelhante ao apresentado no presente estudo, revelando que tanto o óleo diesel, como a sua fração acomodada em água, foram incapazes de alterar significativamente os níveis de GST na glândula digestiva desse gastrópode. Resposta metabólica semelhante também foi observada em estudo com o mexilhão *Mytilus galloprovincialis* de águas temperadas da costa atlântica de Portugal (LIMA *et al.*, 2007).

Tanto LPO quanto PCO foram utilizados no presente estudo como marcadores de lesão oxidativa em estruturas celulares na glândula digestiva de *N. concinna*. Enquanto, a peroxidação lipídica (LPO) revela danos oxidativos causados por ROS em lipídeos insaturados, a carbonilação proteica (PCO) indica danos causados às proteínas. A peroxidação de ácidos graxos insaturados pode ser acelerada pela ação de radicais livres e ROS, em especial o radical hidroxil, o qual é altamente reativo e capaz de transitar livremente através de membranas biológicas, levando à modificações na permeabilidade da membrana e desestabilização da bicamada lipídica (VALKO *et al.*, 2007). Todavia, a exposição à xenobióticos pode acelerar a oxidação proteica, e promover alterações conformacionais que resultam na perda de atividade biológica das proteínas (FERREIRA *et al.*, 2007).

No presente estudo, não foi observado aumento de PCO nos animais expostos ao diesel, embora tenha sido verificado aumento dos níveis de LPO. Nesse caso, os baixos níveis de PCO podem ser decorrentes de rápida remoção seletiva por digestão proteolítica, ao qual proteínas oxidadas estão sujeitas. Em células sob estresse oxidativo, a degradação seletiva de proteínas oxidadas previne a formação de grandes agregados ou de fragmentos potencialmente tóxicos, protegendo as células dos seus efeitos deletérios (BOTA & DAVIES, 2002; SHRINGARPURE & DAVIES, 2002). Assim, o aumento de LPO sem o aumento de PCO pode ser

decorrente da rápida degradação de proteínas carboniladas, e não é incompatível com a existência de estresse oxidativo na glândula digestiva de *N. concinna*.

As defesas antioxidantes branquial e muscular de *N. concinna* foram avaliadas pelos níveis de GR, SOD, CAT e G6PDH. Contudo, no pé muscular, os níveis de GR ficaram abaixo do limite de detecção. A massa reduzida de tecido branquial impossibilitou a determinação dos níveis de LPO e PCO, como marcadores de danos oxidativos nesse tecido.

Os níveis de GR no tecido branquial foram modulados positivamente na presença de óleo diesel. Essa resposta foi dose dependente e não foi modulada nem pelo aquecimento em 4°C e nem pela baixa salinidade. Esse tipo de resposta atende os critérios para a escolha de biomarcadores (LAM, 2009). Também não foram observadas interações termo-salinas capazes de modular o efeito do óleo diesel sobre os níveis de GR.

Apesar da falta de trabalhos avaliando a GR de *N. concinna* como um possível biomarcador de exposição ao óleo diesel, o presente estudo revelou a GR branquial como um potencial biomarcador de exposição ao óleo diesel considerando que: a) os níveis de GR branquial do controle experimental e do referencial da natureza foram estatisticamente iguais, mostrando que a condição experimental controle não foi capaz de modular os níveis da enzima; b) temperatura, salinidade e interações entre esses dois fatores e o óleo diesel, não foram capazes de modular os níveis dessa enzima nas brânquias; c) a exposição ao óleo diesel modulou positivamente os níveis de GR branquial, sendo esse efeito dose dependente. Embora a exposição ao diesel não tenha sido capaz de modular os níveis de GR no fígado do peixe *Carassius auratus* (ZHANG *et al.*, 2004), esse óleo foi eficaz modulando os níveis dessa enzima nas brânquias e glândula digestiva do molusco *Mytilus galloprovincialis* (LIMA *et al.*, 2007), bem como na glândula digestiva da ostra *Crassostrea brasiliana* (LUCHMANN *et al.*, 2011).

Os níveis de SOD muscular e branquial foram modulados de forma distinta pelo óleo diesel nesses dois tecidos. Um intenso efeito negativo foi observado no pé muscular de *N. concinna*, sendo que nas brânquias, o diesel não foi capaz de modular os níveis da SOD. Contudo, o aquecimento em 4°C elevou os níveis de SOD nesses dois tecidos. Assim, a exposição ao óleo diesel reduziu o potencial dismutador da SOD no pé muscular desse gastrópode, tornando-o mais vulnerável aos danos oxidativos provocados pelo aumento desse radical livre.

A falta de informações sobre o efeito do óleo diesel na defesa antioxidante do pé muscular de *N. concinna*, bem como de outros moluscos, dificultou a

discussão dos resultados obtidos. Todavia, diversos estudos relatam o efeito de HPAs em brânquias. Ao contrário do observado no presente estudo, na ostra *Crassostrea brasiliiana*, a exposição à fração de diesel acomodada em água levou à diminuição dos níveis de SOD tanto na glândula digestiva quanto nas brânquias (LUCHMANN *et al.*, 2011). Já no bivalve *Perna viridis*, semelhante ao observado em *N. concinna*, a exposição à benzo[a]pireno (BaP), um hidrocarboneto policíclico aromático, não foi capaz de alterar significativamente os níveis de SOD branquiais desse molusco (CHEUNG *et al.*, 2001).

O aquecimento em 4°C foi capaz de modular positivamente os níveis de SOD nos três tecidos estudados de *N. concinna*. Na glândula digestiva e nas brânquias o efeito da temperatura ficou mais evidente do que no pé muscular. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Abele *et al.* (1998), que relataram aumento dos níveis de SOD branquial e visceral de *N. concinna* no aquecimento em 4°C. Já a salinidade foi capaz de modular os níveis de SOD nas brânquias e pé muscular, nos quais a baixa salinidade elevou levemente os níveis de SOD em ambos os tecidos quando comparado à salinidade de 35. Entretanto, a variação de salinidade não foi capaz de modular os níveis de SOD na glândula digestiva. O pé muscular foi o único tecido em que interação entre os fatores estudados, (temperatura, salinidade e diesel) foi capaz de alterar significativamente os níveis de SOD.

A exposição de *N. concinna* ao óleo diesel reduziu o potencial branquial de decomposição de H_2O_2 pela CAT, que apresentou níveis sensivelmente mais baixos na presença de diesel. Esse efeito foi dose dependente e atende aos critérios de uma resposta biomarcadora. Já o tecido muscular elevou levemente os níveis de CAT na presença de óleo diesel. Dessa forma, apenas o tecido branquial de *N. concinna* teve a sua defesa antioxidante reduzida na exposição ao óleo diesel.

O aumento dos níveis de CAT em brânquias de diversos invertebrados expostos à hidrocarbonetos tem sido amplamente reportado (CHEUNG *et al.*, 2001; RICHARDSON *et al.*, 2008; LAVARÍAS *et al.*, 2011; MARIA & BEBIANNO, 2011). Entretanto, semelhante ao presente estudo, Pereira *et al.* (2007) constataram que mexilhões *Perna perna* coletados em locais contaminados por HPAs, apresentavam níveis baixos de catalase branquial. Estudos com peixes também revelaram que hidrocarbonetos derivados do petróleo tem efeito modulador negativo sobre os níveis de CAT branquial (ZHANG *et al.*, 2004; NAHRGANG *et al.*, 2010; OTITOLOJU & OLAGOKE, 2011).

O aquecimento em 4°C reduziu de forma intensa os níveis de CAT branquial, basicamente na presença de diesel. Em estudo conduzido com *N. concinna* da zona

entre marés, onde a temperatura varia entre 0 e 9°C durante a primavera/verão austral, ficou evidente que o aumento de temperatura tem efeito discreto sobre os níveis normalizados de CAT branquial (ABELE *et al.*, 1998). No presente estudo, o aquecimento em 4°C modulou negativamente os níveis branquiais de CAT, comparando o grupo de organismos aclimatados em 4°C com os de 0°C, independente da presença de diesel. Dessa forma, esse efeito só ficou evidente devido a uma fraca interação termo-diesel ($p=0,082$). Assim, o efeito da temperatura sobre os níveis de CAT foi discreto no presente estudo, comparando apenas os controles experimentais nas temperaturas de 0°C e 4°C, o que corrobora com os resultados encontrados por Abele *et al.* (1998).

A defesa antioxidante do pé muscular de *N. concinna* foi estudada por Weihe *et al.* (2010), comparando a razão glutathiona oxidada/reduzida como indicador da capacidade tamponante redox dos morfotipos do sublitoral e da zona entre marés, concluindo que a sobrevivência desse patelídeo na zona entre marés demanda respostas metabólicas típicas de exposição ao estresse. Contudo, o aumento dos níveis de MDA na exposição aérea desse gastrópode são compatíveis com o aumento na produção de ROS e peroxidação lipídica. Nesse sentido, o presente estudo revelou que o pé muscular de *N. concinna* apresenta capacidade limitada de indução de respostas antioxidantes na presença de óleo diesel, com leve modulação positiva dos níveis de CAT e negativa de SOD.

O aumento da concentração catalítica de G6PDH tem sido considerado um parâmetro histoquímico dos estágios iniciais de carcinogênese hepatocelular em peixes. Contudo, a G6PDH de organismos marinhos é sensível à inativação pela exposição crônica à xenobióticos em ambientes altamente contaminados (VAN NOORDEN *et al.*, 1997; KÖHLER & VAN NOORDEN, 1998; WINZER *et al.*, 2002; KOEHLER *et al.*, 2004). Nesse sentido, os resultados do presente estudo estão alinhados com a literatura, no qual os níveis de G6PDH muscular e branquial de *N. concinna* foram modulados negativamente na exposição ao diesel. O efeito modulador negativo de hidrocarbonetos sobre os níveis de G6PDH também ficou evidente no fígado do peixe *Oncorhynchus mykiss* (TINTOS *et al.*, 2008).

Embora o óleo diesel tenha modulado os níveis de G6PDH nos tecidos branquial e muscular de *N. concinna*, a exposição ao óleo diesel afetou de forma mais intensa o tecido muscular, no qual a dose de 1% de diesel foi suficientemente elevada para induzir níveis de G6PDH tão baixos quanto na dose de 5%. Os níveis dessa enzima nas brânquias foram modulados negativamente pelo aquecimento ($p=0,034$) e positivamente pela baixa salinidade ($p=0,043$). Já no pé muscular,

apenas a baixa salinidade foi capaz de modular positivamente ($p=0,26$) a atividade dessa enzima. Contudo, ficou evidente o efeito de uma complexa interação termo-salina-diesel sobre os níveis da G6PDH muscular. Esse comportamento complexo dificulta a recomendação da G6PDH branquial e muscular como biomarcador de exposição ao óleo diesel. Os resultados também sugerem que o óleo diesel é capaz de induzir uma resposta não protetora sobre os tecidos muscular e branquial de *N. concinna*, reduzindo os níveis de G6PDH, que catalisa reação chave no tamponamento redox dos tecidos, mantendo níveis teciduais adequados de $\text{NADPH}+\text{H}^+$ e, indiretamente, de glutathiona reduzida (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

O $\text{NADPH}+\text{H}^+$ é um dos principais substratos utilizados em reações biossintéticas redutivas. As enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), 6-fosfogliconato desidrogenase (6-PGDH) e enzima málica (ME) são as principais desidrogenases geradoras de poder redutor na forma de $\text{NADPH}+\text{H}^+$ (BARROSO *et al.*, 1998). Em moluscos, já foi reportada a presença de 6-PGDH na glândula digestiva, tecido do manto e demais tecidos moles (GABBOTT & HEAD, 1980; ROMERO-RUIZ *et al.*, 2003), bem como de ME no músculo adutor e brânquias (HOCHACHKA & MUSTAFA, 1973; BRODEY & BISHOP, 1992a; b). Tendo em vista a diminuição dos níveis de G6PDH e aumento de GR em brânquias de *N. concinna* exposta ao diesel, os resultados sugerem que o $\text{NADPH}+\text{H}^+$ necessário para manter a glutathiona reduzida pode estar sendo suprido pela reação catalisada pela ME. Diferente do tecido branquial, os níveis de GR no pé muscular ficaram abaixo do limite de detecção, e deve ser objeto de novos estudos que possam esclarecer como o sistema tamponante redox do pé muscular de *N. concinna* é mantido, considerando que esse tecido apresenta níveis relativamente altos de glutathiona (WEIHE *et al.*, 2010).

No presente estudo, as concentrações de óleo diesel utilizadas de 1% e 5% são elevadas, considerando os estudos com as frações acomodada e solúvel de diesel em água (DEDE & KAGLO, 2001; ANSALDO *et al.*, 2005; LAVARÍAS *et al.*, 2011). Todavia, em locais próximo de estações científicas e nos acidentes com vazamento de óleo diesel, é possível que os organismos da zona entre marés fiquem expostos a concentrações tão elevadas de diesel, visto que esse óleo, quando presente no solo, pode ser transportado pela água de degelo, atingindo diretamente a zona entre marés, antes de o óleo ser diluído pela água do mar. A forte diminuição dos níveis de G6PDH de forma dose não dependente no pé muscular de *N. concinna* pode ser em decorrência da alta concentração de diesel utilizada. Dessa forma, são necessários maiores estudos com menores concentrações de óleo diesel para verificar a existência de uma resposta inibitória

dose dependente dos níveis de G6PDH muscular em *N. concinna*. Contudo, mesmo na existência de uma resposta dose dependente ao diesel, a G6PDH não seria boa candidata a biomarcador, pois é afetada pela salinidade, e pela interação entre temperatura e salinidade, bem como pela interação entre os três fatores (temperatura, salinidade e diesel).

Vários estudos indicam que as enzimas da defesa antioxidante em invertebrados são bons biomarcadores de poluição por HPAs, especialmente em relação aos níveis de SOD e CAT. Porte *et al.* (1991) reportaram que existe uma boa correlação entre a indução de CAT e SOD na glândula digestiva do bivalve *Mytilus galloprovincialis* coletados em locais contaminados por HPAs. Niyogi e colaboradores (2001) constataram que os níveis de SOD, CAT e GST na glândula digestiva da craca *Balanus balanoides* sofrem modulação positiva na presença de HPAs e representam bons biomarcadores para a avaliação de contaminação de ecossistemas aquáticos com esses hidrocarbonetos. Todavia, no presente estudo, os níveis de CAT, SOD e GST em *N. concinna* não se mostraram como bons biomarcadores de exposição ao óleo diesel.

Embora a exposição ao óleo diesel tenha modulado os níveis de SOD e CAT de *N. concinna*, os níveis de SOD nos três tecidos e de CAT nas brânquias também foram modulados pela temperatura e salinidade, bem como por interações envolvendo esses fatores. Apesar da modulação positiva dos níveis de CAT muscular pelo diesel, sem o efeito aparente de outros fatores, os níveis musculares dessa enzima foram significativamente maiores nos animais do grupo referência da natureza em relação ao controle experimental, revelando que as condições ambientais da zona entre marés são capazes de modular os níveis de CAT muscular de forma distinta do controle experimental. Já os níveis de GST da glândula digestiva não foram modulados na exposição ao óleo diesel. Como o ambiente da zona entre marés da Ilha Rei George na Antártica é inconstante e apresenta variações de temperatura entre 0 e 9°C durante a primavera/verão austral (ABELE *et al.*, 1998), bem como recebe águas de degelo capazes de alterar a salinidade das poças d'água, essas flutuação limitam o uso dessas enzimas como biomarcadores de exposição ao óleo diesel. Por outro lado, a exposição ao óleo diesel foi capaz de modular positivamente de forma dose dependente os níveis de GR nas brânquias de *N. concinna*, sem efeito de outros fatores isolados ou com interações, revelando o potencial biomarcador da GR branquial à exposição ao óleo diesel.

Embora o óleo diesel tenha modulado positivamente os níveis de LPO na glândula digestiva de *N. concinna*, semelhante ao relatado por Ansaldo *et al.* (2005),

os níveis de LPO também foram modulados pela baixa salinidade. Já os níveis de PCO não foram modulados pelo diesel isoladamente. Isso, certamente, limita a recomendação desses marcadores de danos oxidativos como biomarcadores de exposição de *N. concinna* ao óleo diesel, embora os níveis viscerais de LPO de alguns bivalves tenham sido postulados como potencial biomarcador de exposição ao óleo diesel (LIMA *et al.*, 2007; SUREDA *et al.*, 2011; TURJA *et al.*, 2013). De forma semelhante, o aumento da temperatura e redução da salinidade também foram capazes de modular os níveis viscerais de LPO no bivalve *Scapharca broughtonii* (AN & CHOI, 2010).

6.2. Metabolismo Energético:

6.2.1. Controle Experimental vs Referencial da Natureza

Os níveis muscular e branquial de HK e PFK dos controles experimentais foram estatisticamente iguais ao referencial da natureza. Entretanto, os níveis de LDH muscular e branquial foram maiores no grupo controle experimental do que na referência da natureza. Essa diferença pode ter sido proporcionada por diferenças nas condições alimentares desses dois grupos de animais. Diversos estudos têm mostrado que o estado alimentar pode interferir com os níveis teciduais de enzimas glicolíticas (POLAKOF *et al.*, 2006; POLAKOF *et al.*, 2007). Por outro lado, os níveis de LDH podem ter sido influenciados por interações termo-salinas. Na condição termo-salina experimental 4°C-25psu, os níveis de LDH foram modulados negativamente em ambos os tecidos, sugerindo que os níveis mais baixos de LDH observados na referência da natureza, podem estar relacionados com possíveis interações termo-salinas naturais, envolvendo o ciclo de marés e a entrada de água de degelo no litoral.

Já os níveis branquiais de CS foram maiores no grupo de animais experimental comparado aos animais do referencial da natureza, mas esse comportamento não foi observado no pé muscular. Como no presente estudo foi observado que o aquecimento em 4°C é capaz de modular negativamente os níveis de CS apenas nas brânquias, os níveis mais baixos de CS na referência da natureza sugerem possível modulação negativa dos níveis dessa enzima, imposta pela exposição de *N. concinna* às temperaturas mais elevadas da zona entre marés durante a baixa mar, na primavera/verão austral.

No presente estudo ficou evidente que o aquecimento em 4°C não tem efeito modulador sobre os níveis de CS do pé muscular de *N. concinna*. Trabalhando com *N. concinna* coletados nas ilhas Rothera e Signy e aclimatados nas temperaturas de 0°C e 3°C, Morley *et al.* (2009) constataram que os níveis de CS muscular não

sofrem alteração no aquecimento em 3°C quando a atividade é normalizada em função da massa úmida de tecido. Contudo, quando a atividade é expressa em função da massa úmida de fibra muscular, os níveis de CS são maiores nos animais aclimatados em 3°C do que em 0°C. Como a atividade específica da CS no presente estudo foi expressa em função da concentração de proteínas, os nossos resultados se alinham melhor com aqueles expressos em função da massa úmida de tecido, descritos por Morley *et al.* (2009).

A enzima MDH participa do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, apresenta distribuição subcelular mitocondrial e citosólica (BRODEY & BISHOP, 1993), e catalisa reversivelmente a redução do oxaloacetato. Esse ácido dicarboxílico é intermediário de diversas vias metabólicas, como o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, ciclo do glioxilato, síntese de aminoácidos, gliconeogênese, bem como da manutenção do balanço redox, no qual participa da troca de metabólitos entre o citoplasma e organelas subcelulares (GOWARD & NICHOLLS, 1994). A capacidade de formar complexos com enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e gliconeogênese, canaliza a transferência de substratos entre reações, otimizando processos metabólicos (GIBSON & MCALISTER-HENN, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2009). A MDH também participa de vias fermentativas em invertebrados, nas quais a resposta inicial à anóxia inclui a oxidação fermentativa de glicogênio e aspartato em alanina e succinato, respectivamente (LARADE & STOREY, 2002). Assim, a participação da MDH nas vias glicogênio-succinato e aspartato-succinato, revela o papel crucial dessa enzima na obtenção de energia por anaerobiose (CARVAJAL *et al.*, 1991; PÖRTNER, 1993).

Os níveis musculares de MDH foram modulados de forma diferente no controle experimental em relação ao referencial da natureza. Nesse caso, o confinamento experimental em 0°C não foi capaz de induzir níveis branquiais diferentes em relação ao referencial da natureza. Esse tipo de resposta metabólica, tecido dependente, foi semelhante ao da CS, considerando que a MDH branquial não foi afetada pela variação experimental de temperatura ou salinidade, enquanto a MDH muscular sofreu forte efeito da interação entre temperatura e salinidade. A modulação dos níveis de MDH de forma distinta no tecido branquial e muscular também pode ter relação com o sua ampla participação em diversas vias e processos metabólicos.

6.2.2. Efeito de diesel, temperatura e salinidade sobre o metabolismo energético

O aumento dos níveis de HK no tecido muscular de *N. concinna*, expostas ao óleo diesel, pode ter relação com o aumento da demanda muscular por glicose-6-fosfato. Esse carboidrato fosforilado é substrato de vias como a glicogênese, via das pentoses e via glicolítica. A exposição de organismos marinhos a fração solúvel de hidrocarbonetos derivados do petróleo é capaz de causar danos ao DNA, como demonstrado por vários autores (JING-JING *et al.*, 2009; FERNÁNDEZ-TAJES *et al.*, 2010; NAHRGANG *et al.*, 2010; CATALANO *et al.*, 2012), bem como causar danos oxidativos aos tecidos de *N. concinna* (ANSALDO *et al.*, 2005). A glicose-6-fosfato é um importante substrato energético utilizado em vias metabólicas, tais como a via das pentoses, que mantém níveis celulares adequados de NADPH+H⁺ para biossíntese de diversos compostos biológicos. Considerando que o óleo diesel não foi capaz de elevar os níveis de enzimas do metabolismo energético aeróbio (CS e MDH) e anaeróbio (LDH), os resultados sugerem que o aumento dos níveis de HK no tecido muscular pode estar relacionado as demandas antioxidantes e manutenção do potencial redutor do tecido muscular, via oxidação da glicose-6-fosfato na via das pentoses. Embora os níveis de GR muscular tenham ficado abaixo do limite de detecção, Weihe *et al.* (2010) reportaram níveis relativamente altos de GSH no tecido muscular de *N. concinna*, sugerindo a presença de GR no tecido. Dessa forma, maiores estudos são necessários para entender de que forma os níveis de GSH são mantidos no pé muscular de *N. concinna*.

Os níveis de HK, tanto nas brânquias quanto no pé muscular, não foram afetados pela salinidade sozinha ou pela interação entre os fatores. A temperatura foi capaz de modular negativamente a HK somente nas brânquias, e não afetou a enzima muscular. Já o diesel causou um aumento significativo da HK muscular, porém não afetou significativamente a enzima branquial.

O fato dos níveis de HK muscular não terem sido afetados pela temperatura e salinidade sozinhas, bem como pela interação entre esses fatores; por apresentar um aumento em resposta à exposição ao diesel; e por não apresentar diferenças estatísticas entre os níveis expressos no controle experimental e no referencial da natureza, revelando que a condição experimental não afetou os níveis de HK muscular de *N. concinna*, essa enzima é uma boa candidata a biomarcador de exposição ao óleo diesel. Contudo, não há dados na literatura que indiquem a HK para esse propósito. Dessa forma, novos estudos devem ser conduzidos para confirmar a HK muscular de *N. concinna* como biomarcador de exposição ao diesel.

A PFK é a principal enzima reguladora da via glicolítica tanto em organismos aeróbios quanto anaeróbios (IBARGUREN *et al.*, 2000; SIMPFENDÖRFER *et al.*, 2006). Normalmente, a PFK apresenta a menor atividade na via glicolítica e tem sido considerada enzima marca passo do metabolismo oxidativo de carboidratos em diversos tecidos (ALVES *et al.*, 2007). Os níveis de PFK no pé muscular de *N. concinna* do controle experimental (0-35) foram cerca de 41% maiores do que os branquiais. Essa diferença pode estar relacionada com as demandas energéticas específicas do pé muscular, inerentes à adesão desse gastrópode às rochas e locomoção. A elevada relação entre ATP:CS no pé muscular de *N. concinna* (WEIHE & ABELE, 2008), bem como a elevada densidade de mitocôndrias subsarcolemais, comparado aos do bivalve antártico *Laternula elliptica* (MORLEY *et al.*, 2009), indicam que o pé muscular de *N. concinna* possui um metabolismo aeróbico bastante ativo.

A incapacidade de *N. concinna* modular os níveis de PFK branquiais e musculares na exposição ao óleo diesel exclui essa enzima como um biomarcador de exposição ao diesel. Contudo a baixa salinidade e o aquecimento em 4°C modularam de maneira distinta a atividade dessa enzima nas brânquias e pé muscular. Esse comportamento sugere demandas glicolíticas distintas nesses dois tecidos impostas por variações térmicas e salinas dos ciclos de marés e águas de degelo durante a primavera/verão austral. Assim, o aquecimento experimental, capaz de modular negativamente os níveis de PFK no tecido muscular, sugere que a exposição desse patelídeo às temperaturas mais elevadas do ambiente terrestre durante a baixa mar sejam capazes de modular negativamente os níveis de PFK. O aumento de temperatura acelera diretamente as velocidades das reações químicas (HOCHACHKA & SOMERO, 2002) e, nesse caso, poderia estar demandando uma concentração catalítica menor de PFK. Por outro lado, a forte interação termo-diesel, capaz de modular negativamente os níveis dessa enzima no aquecimento em 4°C, sugere uma resposta não protetora. Nesse caso, o aquecimento pode ter aumentado a concentração de hidrocarbonetos solubilizados na água e, consequentemente, elevado o seu efeito tóxico sobre o pé muscular.

Brânquias e pé muscular de *N. concinna* modularam os níveis de PFK de forma distinta em relação a temperatura e salinidade. Nas brânquias a temperatura não foi capaz de modular os níveis dessa enzima, mas a baixa salinidade modulou positivamente. Isso ficou muito evidente na forte interação termo-salina em 4-25 capaz de elevar acentuadamente os níveis de PFK, inclusive na presença de óleo diesel, sugerindo que o aquecimento na baixa salinidade pode induzir uma resposta protetora capaz de elevar o potencial metabólico branquial gerador de ATP.

O óleo diesel não foi capaz de modular expressivamente os níveis de LDH branquial e muscular de *N. concinna*, embora tenha sido observada uma tendência de redução dos níveis branquiais de LDH na exposição ao diesel. Gagnon & Holdway (1999) obtiveram um resultado semelhante nas brânquias do peixe *Salmo salar*, onde a exposição dos animais à fração acomodada de petróleo bruto em água, modulou negativamente os dos níveis de LDH e CS. A temperatura e a salinidade tenderam a elevar os níveis de LDH muscular e branquial de *N. concinna*, contudo, semelhante a MDH, uma forte interação termo-salina em 4-25 foi capaz de modular negativamente os níveis de LDH. Esse comportamento sugere que o potencial anaeróbio gerador de ATP desse gastrópode pode ser modulado em função de flutuações termo-salinas na zona entre marés.

Enquanto os níveis de CS branquiais foram modulados negativamente pelo aquecimento, o mesmo não foi observado no tecido muscular de *N. concinna*. Também ficou evidente que a redução da salinidade e a exposição ao óleo diesel não têm efeito modulador sobre os níveis de CS muscular e branquial. Contudo, tanto os níveis de CS branquial quanto muscular foram modulados negativamente por interação salina-diesel, revelando que interações termo-salinas impostas pelos ciclos de marés e águas de degelo podem modular os efeitos do óleo diesel sobre os níveis de CS.

A incapacidade do óleo diesel, baixa salinidade e aquecimento em 4°C modularem os níveis de MDH branquial sugere que os níveis dessa enzima podem estar sendo expressos em concentrações catalíticas suficiente para atender demandas metabólicas das brânquias desse gastrópode nas condições flutuantes de salinidade e temperatura da zona entre marés. Contudo, os níveis de MDH do pé muscular tenderam a aumentar no aquecimento e na baixa salinidade, mas essa tendência foi modulada negativamente por interação termo-salina em 4-25. Esse comportamento exclui a MDH como um biomarcador de exposição ao óleo diesel.

Efeito semelhante foi observado por Long *et al.* (2003) no tecido branquial do bivalve *Mytilus edulis planulatus*, exposto à diferentes concentrações de fração acomodada de petróleo bruto na água. Nesse caso, os autores postularam que os hidrocarbonetos presentes na fração acomodada de petróleo podem não ter sido incorporados às membranas biológicas de *M. edulis planulatus*, o que pode explicar a ausência de efeitos sobre a respiração celular. Algo semelhante pode ter acontecido com *N. concinna* aclimatado na presença de diesel, no qual os níveis branquiais e musculares de CS, MDH e LDH, tradicionalmente utilizados com marcadores do metabolismo energético, considerando que os animais

permaneceram no fundo dos aquários durante o período de exposição ao diesel e consequentemente ficaram expostos apenas à fração solúvel de hidrocarbonetos.

6.3. Metabolismo Argininolítico

6.3.1. Controle Experimental vs Referencial da Natureza

As arginases são enzimas amplamente distribuídas na natureza e em tecidos animais (JENKINSON *et al.*, 1996). A distribuição tecidual em invertebrados marinhos antárticos foi estudada no bivalve filtrador *Laternula elliptica* e no gastrópode *N. concinna*. O rim de *L. elliptica* concentra a maior parte da atividade argininolítica desse bivalve, bem como apresenta elevado potencial gerador de ATP (RODRIGUES *et al.*, 2009). Nesse caso, os autores sugerem que localização celular da arginase pode estar atendendo necessidades fisiológicas desse bivalve durante o período de dormência metabólicas, imposto pelo longo período de inverno. Já no gastrópode *N. concinna*, o tecido branquial apresentou os níveis mais elevados de arginase, seguido do muscular (uma ordem de grandeza menor) e do "pool" dos demais tecidos (Rodrigues *et al.*, 2011). O provável papel fisiológico da arginase branquial pode estar relacionado com o controle dos níveis de L-arginina nos fluidos biológicos, considerando que o metabolismo energético desse gastrópode é baseado em proteínas (CLARKE, 1989). Contudo, quando esse patelídeo é alimentado após um longo período de jejum, uma quantidade significativa de carboidratos e lipídeos é utilizada para suprir as suas demandas energéticas (PECK & VEAL, 2001).

A concentração de fosfo-L-arginina no pé muscular de *N. concinna*, na condição térmica de 0°C, gira em torno de 4,4 $\mu\text{mol/g}$ de peso úmido e tem papel fundamental na manutenção dos níveis de ATP, especialmente, na recuperação do estresse causado pelo aumento de temperatura (PÖRTNER *et al.*, 1999). No mesmo estudo, também ficou claro que o deslocamento da reação de fosfo-L-arginina para L-arginina, na qual um fosfato de alta energia é transferido para o ADP formando ATP, foi acompanhado pela redução dos níveis musculares de L-arginina. Contudo, os autores não foram capazes de identificar o caminho metabólico responsável pela redução dos níveis de L-arginina e sugeriram a via argininolítica como provável responsável pela redução.

Embora com uma tendência a níveis mais baixos no referencial da natureza, a ARG branquial não apresentou diferença estatística entre o grupo controle experimental e o referencial da natureza. Todavia, no pé muscular, os níveis de ARG foram significativamente menores no grupo referencial da natureza do que no controle experimental.

O óxido nítrico é um radical livre que atua como sinalizador celular desempenhando diversos papéis na fisiologia e patologia de vários tecidos, incluindo o sistema imune (WENDEHENNE *et al.*, 2001; KARPUZOGLU & AHMED, 2006; DE BONO *et al.*, 2007). A produção de óxido nítrico é realizada a partir de L-arginina pela reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), e ocorre em todas as células e tecidos de mamíferos (JOBGEN *et al.*, 2006; JENSEN, 2009). Dessa forma, ocorre uma competição pelo substrato L-arginina entre a NOS e a ARG.

A sinalização por óxido nítrico, incluindo neurotransmissão e neuromodulação, está amplamente distribuída entre os invertebrados (JACKLET, 1997). Em moluscos, a NOS está presente em poliplacóforos, gastrópodes e cefalópodes (MOROZ & GILLETTE, 1995), e atribui-se à essa enzima diversas funções biológicas relacionadas à alimentação, defesa, estresse ambiental, regulação metabólica de respostas à hipóxia e anóxia, memória e aprendizado, metamorfose, natação, agregação de hemócitos, potencialização muscular, entre outros (ELPHICK *et al.*, 1995; MOROZ *et al.*, 2000; KATZOFF *et al.*, 2002; NEWCOMB & WATSON, 2002; GAINEY & GREENBERG, 2003; TAFALLA *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2003; LEISE *et al.*, 2004; PALUMBO, 2005; PALUMBO & D'ISCHIA, 2007; IVANINA *et al.*, 2010).

Os níveis mais elevados de arginase no pé muscular do controle experimental comparado aos animais do referencial da natureza podem ter relação com o controle da atividade de NOS presente nos animais da natureza. A relação entre a atividade da ARG e NOS tem sido estudada e postulado que a disponibilidade de L-arginina pode ser um fator crítico no controle da atividade da NOS em células (MORI & GOTOH, 2000). No habitat natural, o gastrópode *N. concinna* está exposto à estressores ambientais, como por exemplo, flutuação de salinidade e temperatura, períodos de hipóxia decorrentes da emersão e exposição à patógenos, que na condição experimental estão ausentes. Dessa forma, níveis menores de ARG no referencial da natureza podem estar relacionados à maior disponibilização de L-arginina, favorecendo a atividade de NOS para recuperação do molusco aos estressores ambientais, já que essa enzima está relacionada à diversas funções biológicas. Em contrapartida, a ausência desses fatores na condição experimental pode ter levado à uma diminuição de NOS no tecido muscular de *N. concinna* e maior disponibilização de L-arginina para a ARG, que consequentemente, teve um aumento nos seus níveis. Contudo, para verificar se essa hipótese está correta, são necessários maiores estudos e a dosagem de NOS no tecido muscular de *N. concinna*.

6.3.2. Efeito do diesel, temperatura e salinidade sobre o metabolismo arginínolítico

A arginase do tecido branquial de *N. concinna* foi modulada de forma distinta do pé muscular, especialmente em relação à exposição ao óleo diesel. Os níveis branquiais de ARG tenderam a valores mais elevados na presença de diesel apenas na condição termo salina 0-35. Provavelmente, essa tendência não ficou evidente nas demais condições termo-salinas devido à modulação negativa da interação salina-diesel na baixa salinidade. Embora o aquecimento em 4°C tenha modulado negativamente os níveis de arginase, a interação termo-salina em 4-25 teve efeito contrário e proporcionou níveis mais elevados de ARG. A interação entre fatores e o efeito discreto do diesel sobre os níveis de arginase, desqualificam essa enzima branquial como biomarcador de exposição ao óleo diesel.

Contudo, o óleo diesel modulou negativamente os níveis de arginase no pé muscular de *N. concinna* em todas as condições termo-salinas, exceto em 4-35. Um aspecto importante na modulação negativa dos níveis de arginase pelo óleo diesel é a possível relação da atividade arginínolítica com os níveis teciduais de óxido nítrico, formado na reação catalisada pela NOS. Essas duas enzimas (ARG e NOS) competem pelo mesmo substrato (L-arginina), sendo que nesse caso, a redução dos níveis de ARG estariam alimentando a reação catalisada pela NOS com níveis mais elevados do aminoácido L-arginina. Dessa forma, como a atividade da ARG tem efeito regulador indireto sobre a atividade da NOS (MORI & GOTOH, 2000) e, consequentemente, sobre os níveis de óxido nítrico, a redução nos níveis de ARG no pé muscular pode estar envolvendo o aumento dos níveis de óxido nítrico, um importante modulador de diversos processos metabólicos em moluscos, como a modulação de respostas ao estresse e defesa imune (FRANCHINI *et al.*, 1995; STEFANO & OTTAVIANI, 2002; IVANINA *et al.*, 2010).

Por outro lado, os níveis de arginase do pé muscular não variaram estatisticamente no aquecimento em 4°C, revelando que a redução dos níveis de L-arginina observados nos experimentos conduzidos por Pörtner *et al.*, (1999) em 4°C, não dependem do aumento da concentração catalítica de ARG. Nesse caso, se a atividade catalítica tivesse sido calculada para temperatura em 4°C, com base na energia de ativação (não determinada), a atividade em 4°C seria maior do que em 0°C, e poderia estar suportando o catabolismo de L-arginina no aquecimento (ABELE *et al.*, 1998). Como os níveis de ARG muscular foram modulados pelo diesel, sem interferência dos demais fatores, essa enzima deve ser melhor estudada como possível biomarcador de exposição ao diesel, pois não foi possível perceber

no presente estudo, de forma clara, um efeito do tipo dose dependente, bem como procurar entender o que poderia estar gerando a diferença entre os níveis do controle experimental e o referencial da natureza.

7. CONCLUSÕES

- As respostas metabólicas de *N. concinna* são parcialmente moduladas pela exposição ao óleo diesel, bem como pelo aquecimento e baixa salinidade, inclusive com interações entre esses três fatores (temperatura, salinidade e óleo diesel);
- As condições instáveis (físicas, químicas e tróficas) da zona entre marés da Antártica são capazes de modular os níveis das enzimas SOD, CAT, LDH, CS, MDH e ARG de *N. concinna*, de forma diferente da condição experimental controle (0°C, 35psu, sem alimentação);
- A exposição de *N. concinna* ao óleo diesel é capaz de elevar parcialmente o potencial antioxidante dos tecidos branquial, muscular e visceral;
- A defesa antioxidante de *N. concinna* é modulada pelo aquecimento e pela baixa salinidade;
- A modulação dos níveis de GR branquial, na exposição ao óleo diesel, atende os requisitos de um biomarcador;
- A defesa antioxidante de *N. concinna* não é capaz de proteger as estruturas celulares da glândula digestiva desse gastrópode de danos oxidativos, considerando o aumento de LPO;
- A exposição ao óleo diesel não é capaz de modular o metabolismo energético dos tecidos branquial e muscular de *N. concinna*, exceto no que diz respeito ao aumento da atividade da HK;
- A modulação dos níveis de HK muscular na exposição ao óleo diesel atende aos critérios de seleção de biomarcadores;
- O metabolismo energético dos tecidos branquial e muscular de *N. concinna* é modulado discretamente pelo aquecimento e baixa salinidade;
- A exposição ao óleo diesel modula negativamente apenas os níveis de ARG muscular, o que favorece a formação de óxido nítrico nesse tecido;
- O aquecimento tem efeito modulador no tecido branquial de *N. concinna*, reduzindo os níveis de ARG.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELE, D.; BURLANDO, B.; VIARENGO, A.; PORTNER, H. O. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 120, n. 2, p. 425-435. 1998.

ABELE, D.; FERREYRA, G. A.; SCHLOSS, I. H₂O₂ accumulation from photochemical production and atmospheric wet deposition in Antarctic coastal and off-shore waters of Potter Cove, King George Island, South Shetland Islands. **Antarctic Science**, Oxford, v. 11, n. 02, p. 131-139. 1999.

AHN, I.-Y. Sentinel Organisms for Pollution Monitoring in Marine Environment Near the Antarctic Stations. In: NSF/COMNAP/SCAR Workshop, 2005, Texas.

AHN, I.-Y.; CHUNG, H.; KANG, J.-S.; KANG, S.-H. Diatom composition and biomass variability in nearshore waters of Maxwell Bay, Antarctica, during the 1992/1993 austral summer. **Polar Biology**, Nova York, v. 17, n. 2, p. 123-130. 1997.

AHN, I.-Y.; CHUNG, K. H.; CHOI, H. J. Influence of glacial runoff on baseline metal accumulation in the Antarctic limpet *Nacella concinna* from King George Island. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 49, n. 1-2, p. 119-127. 2004.

AHN, I.-Y.; KIM, K.-W.; CHOI, H. J. A baseline study on metal concentrations in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Gastropoda: Patellidae) on King George Island: variations with sex and body parts. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 424-431. 2002.

AHN, I. Y.; CHOI, H. J.; KIM, K. W. Heavy metal pollution monitoring at King Sejong Station, King George Island, Antarctica. **Ocean and Polar Research**, Coréia do Sul, v. 25, n. 4, p. 645-652. 2003.

AHN, I. Y.; LEE, S. H.; KIM, K. T.; SHIM, J. H.; KIM, D. Y. Baseline heavy Metal concentrations in the Antarctic Clam, *Laternula elliptica* in Maxwell Bay, King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 32, n. 8-9, p. 592-598. 1996.

AISLABIE, J.; BALKS, M.; ASTORI, N.; STEVENSON, G.; SYMONS, R. Polycyclic aromatic hydrocarbons in fuel-oil contaminated soils, Antarctica. **Chemosphere**, Oxford, v. 39, n. 13, p. 2201-2207. 1999.

AISLABIE, J. M.; BALKS, M. R.; FOGHT, J. M.; WATERHOUSE, E. J. Hydrocarbon spills on Antarctic soils: Effects and management. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 38, n. 5, p. 1265-1274. 2004.

ALONSO-ALVAREZ, C.; MUNILLA, I.; LÓPEZ-ALONSO, M.; VELANDO, A. Sublethal toxicity of the Prestige oil spill on yellow-legged gulls. **Environment International**, Nova York, v. 33, n. 6, p. 773-781. 2007.

ALVES, G. G.; MARINHO-CARVALHO, M. M.; ATELLA, G. C.; SILVA-NETO, M. A. C.; SOLA-PENNA, M. Allosteric regulation of 6-phosphofructo-1-kinase activity of fat body and flight muscle from the bloodsucking bug *Rhodnius prolixus*. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 1, p. 53-62. 2007.

AN, M. I.; CHOI, C. Y. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: Effects on hemolymph and biochemical parameters. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 155, n. 1, p. 34-42. 2010.

ANSALDO, M.; DI FONZO, C.; ZAPPALA, C.; ROSA, G.; WIDER, E. Oxidative stress and antioxidant responses generated by diesel on the digestive gland of the Antarctic limpet *Nacella concinna*. In: XXXI SCAR - Open Science Conference, 2010, Buenos Aires.

ANSALDO, M.; NAJLE, R.; LUQUET, C. M. Oxidative stress generated by diesel seawater contamination in the digestive gland of the Antarctic limpet *Nacella concinna*. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 59, n. 4, p. 381-390. 2005.

ANSALDO, M.; SACRISTÁN, H.; WIDER, E. Does starvation influence the antioxidant status of the digestive gland of *Nacella concinna* in experimental conditions? **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Oxford, v. 146, n. 1-2, p. 118-123. 2007.

ARIGONY-NETO, J.; SIMÕES, J. C.; BREMER, U. F. Implementation of the Admiralty Bay Geographic Information System, King George Island, Antarctica. **Pesquisa Antártica Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 187-190. 2004.

BALDWIN, J.; ELIAS, J. P.; WELLS, R. M. G.; DONOVAN, D. A. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: Comparisons with temperate abalone species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 342, n. 2, p. 213-225. 2007.

BARGAGLI, R. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 400, n. 1-3, p. 212-226. 2008.

BARNES, D. K. A.; PECK, L. S. Vulnerability of Antarctic shelf biodiversity to predicted regional warming. **Climate Research**, Oldendorf, v. 37, n. 2-3, p. 149-163. 2008.

BARNES, D. K. A.; ROTHERY, P.; CLARKE, A. Colonisation and development in encrusting communities from the Antarctic intertidal and sublittoral. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 196, n. 1-2, p. 251-265. 1996.

BARRETT, P. Palaeoclimatology: Cooling a continent. **Nature**, Londres, v. 421, n. 6920, p. 221-223. 2003.

BARROSO, J. B.; PERAGÓN, J.; CONTRERAS-JURADO, C.; GARCÍA-SALGUERO, L.; CORPAS, F. J.; ESTEBAN, F. J.; PEINADO, M. A.; DE LA HIGUERA, M.; LUPIÁÑEZ, J. A. Impact of starvation-refeeding on kinetics and protein expression of trout liver NADPH-production systems. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 274, n. 6, p. R1578-R1587. 1998.

BENEDETTI, M.; MARTUCCIO, G.; FATTORINI, D.; CANAPA, A.; BARUCCA, M.; NIGRO, M.; REGOLI, F. Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 167-175. 2007.

BONNER, W. N. Antarctic science and conservation - The historical background. **Environment International**, Nova York, v. 13, n. 1, p. 19-25. 1987.

BORKOVIC, S. S.; PAVLOVIC, S. Z.; KOVACEVIC, T. B.; STAJN, A. Å.; PETROVIC, V. M.; SAICIC, Z. S. Antioxidant defence enzyme activities in hepatopancreas, gills and muscle of Spiny cheek crayfish (*Orconectes limosus*) from the River Danube. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, Oxford, v. 147, n. 1, p. 122-128. 2008.

BOTA, D. A.; DAVIES, K. J. A. Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. **Nature Cell Biology**, Londres, v. 4, n. 9, p. 674-680. 2002.

BOWDEN, D. A.; CLARKE, A.; PECK, L. S.; BARNES, D. K. A. Antarctic sessile marine benthos: colonisation and growth on artificial substrata over three years. **Marine Ecology Progress Series**, Amelinghausen, v. 316, p. 1-16. 2006.

BRAUN, M.; SIMÕES, J. C.; VOGT, S.; BREMER, U. F.; BLINDOW, N.; PFENDER, M.; SAURER, H.; AQUINO, F. E.; FERRON, F. A. An improved topographic database for King George Island: compilation, application and outlook. **Antarctic Science**, Oxford, v. 13, n. 01, p. 41-52. 2001.

BRETHES, J. C.; FERREYRA, G.; DELAVEGA, S. Distribution, growth and reproduction of the limpet *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel 1908) in relation to potential food availability, in Esperanza Bay (Antarctic Peninsula). **Polar Biology**, Nova York, v. 14, n. 3, p. 161-170. 1994.

BRODEY, M. M.; BISHOP, S. H. Malic enzyme from ribbed mussel (*Modiolus demissus*) gill tissue mitochondria. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Nova York, v. 103, n. 2, p. 305-312. 1992a.

BRODEY, M. M.; BISHOP, S. H. Mitochondrial malic enzyme from ribbed mussel (*Modiolus demissus*) gill tissue: native molecular weight, divalent metal ion requirement and effect of hydroxymalonate. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Nova York, v. 101, n. 3, p. 461-470. 1992b.

BRODEY, M. M.; BISHOP, S. H. Cytosolic and mitochondrial l-malate dehydrogenases from ribbed mussel (*Modiolus demissus*) gill tissue. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Nova York, v. 104, n. 2, p. 327-339. 1993.

BUDRETSKI, A. B. New absolute minimum of air temperature. **Sovetskaia Antarkticheskaia ekspeditsiia. Informatsionnyi biulletin**, Columbus, v. 105, p. 82. 1984.

BUSTAMANTE, M.; TAJADURA-MARTÍN, F. J.; SAIZ-SALINAS, J. I. Temporal and spatial variability on rocky intertidal macrofaunal assemblages affected by an oil spill (Basque coast, northern Spain). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Plymouth, v. 90, n. 07, p. 1305-1317. 2010.

CADÉE, G. C. Shell damage and shell repair in the Antarctic limpet *Nacella concinna* from King George Island. **Journal of Sea Research**, Texel, v. 41, n. 1-2, p. 149-161. 1999.

CALABRESE, E. J. Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 511, n. 3, p. 181-189. 2002.

CALABRESE, E. J. Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. **Environmental Pollution**, Barking, v. 138, n. 3, p. 378-411. 2005.

CARVAJAL, N.; KESSI, E.; TORRES, C.; MARÍN, O.; TORRES, V.; CAMPOS, A.; POSADA, C. Properties and possible role of malate dehydrogenase in the foot muscle of the sea mollusc *Concholepas concholepas* (Gastropoda: Muricidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Nova York, v. 99, n. 1, p. 83-86. 1991.

CATALANO, B.; MOLTEDO, G.; MARTUCCIO, G.; GASTALDI, L.; VIRNO-LAMBERTI, C.; LAURIA, A.; AUSILI, A. Can *Hediste diversicolor* (Nereidae, Polychaete) be considered a good candidate in evaluating PAH contamination? A multimarker approach. **Chemosphere**, Oxford, v. 86, n. 9, p. 875-882. 2012.

CHEUNG, C. C. C.; SIU, W. H. L.; RICHARDSON, B. J.; DE LUCA-ABBOTT, S. B.; LAM, P. K. S. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. **Environmental Pollution**, Barking, v. 128, n. 3, p. 393-403. 2004.

CHEUNG, C. C. C.; ZHENG, G. J.; LI, A. M. Y.; RICHARDSON, B. J.; LAM, P. K. S. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 52, n. 3-4, p. 189-203. 2001.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, Berlin, v. 52, n. 3, p. 273-283. 1979.

CHOY, E. J.; PARK, H.; KIM, J.-H.; AHN, I.-Y.; KANG, C.-K. Isotopic shift for defining habitat exploitation by the Antarctic limpet *Nacella concinna* from rocky coastal habitats (Marian Cove, King George Island). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, Londres, v. 92, n. 3, p. 339-346. 2011.

CHWEDORZEWSKA, K. J.; KORCZAK, M.; BEDNAREK, P. T.; MARKOWSKA-POTOCKA, M. Low genetic differentiation between two morphotypes of the gastropod *Nacella concinna* from Admiralty Bay, Antarctica. **Polish Polar Research**, Łódź, v. 31, n. 2, p. 195-200. 2010.

CIARDIELLO, A. M.; CAMARDELLA, L.; DI PRISCO, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two Antarctic teleosts: Correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v. 1250, n. 1, p. 76-82. 1995.

CLARKE, A. Faecal production and an estimate of food intake in the wild of the antarctic limpet *Nacella concinna* (Strebel). **Journal of Molluscan Studies**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 261-262. 1989.

CLARKE, A. Costs and consequences of evolutionary temperature adaptation. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 18, n. 11, p. 573-581. 2003.

CLARKE, A.; BARNES, D. K. A.; HODGSON, D. A. How isolated is Antarctica? **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 1-3. 2005.

CLARKE, A.; HOLMES, L. J.; WHITE, M. G. The annual cycle of temperature, chlorophyll and major nutrients at Signy Island, South Orkney Islands, 1969-82. **British Antarctic Survey Bulletin**, Cambridge, v. 80, p. 65-86. 1988.

CLARKE, A.; JOHNSTON, N. M.; MURPHY, E. J.; ROGERS, A. D. Introduction. Antarctic ecology from genes to ecosystems: the impact of climate change and the importance of scale. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v. 362, n. 1477, p. 5-9. 2007.

CLARKE, A.; MURPHY, E. J.; MEREDITH, M. P.; KING, J. C.; PECK, L. S.; BARNES, D. K. A.; SMITH, R. C. Climate change and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v. 362, n. 1477, p. 149-166. 2007.

COHEN, H. K. **Handbook of the Antarctic Treaty**. Washington: United States Department of State, Under Secretary for Democracy and Global Affairs, Bureau of Oceans and International Environmental and Scientific Affairs Report, 993. 2002.

CRIPPS, G. C. Natural and anthropogenic hydrocarbons in the Antarctic marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 25, n. 9-12, p. 266-273. 1992.

CRIPPS, G. C.; PRIDDLE, J. Hydrocarbons in the Antarctic marine environment. **Antarctic Science**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 233-250. 1991.

CRIPPS, G. C.; SHEARS, J. The Fate in the Marine Environment of a Minor Diesel Fuel Spill From an Antarctic Research Station. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 46, p. 221-232. 1997.

CURTOSI, A.; PELLETIER, E.; VODOPIVEZ, C. L.; MAC CORMACK, W. P. Distribution of PAHs in the water column, sediments and biota of Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. **Antarctic Science**, Oxford, v. 21, n. 04, p. 329-339. 2009.

DAVENPORT, J. Meltwater effects on intertidal Antarctic limpets, *Nacella concinna*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Plymouth, v. 81, n. 4, p. 643-649. 2001.

DE ARANZAMENDI, M.; SAHADE, R.; TATIÁN, M.; CHIAPPERO, M. Genetic differentiation between morphotypes in the Antarctic limpet *Nacella concinna* as revealed by inter-simple sequence repeat markers. **Marine Biology**, Berlin, v. 154, n. 5, p. 875-885. 2008.

DE ARANZAMENDI, M. C.; MARTÍNEZ, J. J.; SAHADE, R. Shape differentiation and characterization in the two morphotypes of the Antarctic limpet *Nacella concinna* using Elliptic Fourier analysis of shells. **Polar Biology**, Nova York, v. 33, n. 9, p. 1163-1170. 2010.

DE BONO, J. P.; WARRICK, N.; BENDALL, J. K.; CHANNON, K. M.; ALP, N. J. Radiochemical HPLC detection of arginine metabolism: Measurement of nitric oxide synthesis and arginase activity in vascular tissue. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 16, n. 1, p. 1-9. 2007.

DECONTO, R. M.; POLLARD, D. Rapid Cenozoic glaciation of Antarctica induced by declining atmospheric CO₂. **Nature**, Londres, v. 421, n. 6920, p. 245-249. 2003.

DEDE, E. B.; KAGLO, H. D. Aqua-toxicological effects of water soluble fractions (WSF) of diesel fuel on *O. niloticus* fingerlings. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, Port Harcourt, v. 5, n. 1, p. 93-96. 2001.

DEHEYN, D. D.; GENDREAU, P.; BALDWIN, R. J.; LATZ, M. I. Evidence for enhanced bioavailability of trace elements in the marine ecosystem of Deception Island, a volcano in Antarctica. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 60, n. 1, p. 1-33. 2005.

DIENI, C. A.; STOREY, K. B. Regulation of hexokinase by reversible phosphorylation in skeletal muscle of a freeze-tolerant frog. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 159, n. 4, p. 236-243. 2011.

DUQUESNE, S.; RIDDLE, M.; SCHULZ, R.; LIESS, M. Effects of contaminants in the Antarctic environment - Potential of the gammarid amphipod crustacean *Paramorea walkeri* as a biological indicator for Antarctic ecosystems based on toxicity and bioaccumulation of copper and cadmium. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 49, n. 1-2, p. 131-143. 2000.

ELLINGTON, W. R. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 63, p. 289-325. 2001.

ELPHICK, M.; KEMENES, G.; STARAS, K.; O'SHEA, M. Behavioral role for nitric oxide in chemosensory activation of feeding in a mollusc. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 15, n. 11, p. 7653-7664. 1995.

EPPLEY, Z. A. Assessing indirect effects of oil in the presence of natural variation: The problem of reproductive failure in South Polar Skuas during the *Bahia Paraíso* oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 25, n. 9-12, p. 307-312. 1992.

FERNÁNDEZ-TAJES, J.; FLÓREZ, F.; PEREIRA, S.; RÁBADE, T.; LAFFON, B.; MÉNDEZ, J. Use of three bivalve species for biomonitoring a polluted estuarine environment. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, p. 1-12. 2010.

FERREIRA, M.; MORADAS-FERREIRA, P.; REIS-HENRIQUES, M. A. The effect of long-term depuration on levels of oxidative stress biomarkers in mullets (*Mugil cephalus*) chronically exposed to contaminants. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 64, n. 2, p. 181-190. 2007.

FERRON, F. A.; SIMÕES, J. C.; AQUINO, F. E.; SETZER, A. W. Air temperature time series for King George Island, Antarctica. **Pesquisa Antártica Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 155-169. 2004.

FIALA, M.; DELILLE, D. Annual changes of microalgae biomass in Antarctic sea ice contaminated by crude oil and diesel fuel. **Polar Biology**, Nova York, v. 21, n. 6, p. 391-396. 1999.

FITZSIMONS, I. C. W. A review of tectonic events in the East Antarctic Shield and their implications for Gondwana and earlier supercontinents. **Journal of African Earth Sciences**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 3-23. 2000.

FRANCHINI, A.; FONTANILI, P.; OTTAVIANI, E. Invertebrate immunocytes: relationship between phagocytosis and nitric oxide production. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 110, n. 2, p. 403-407. 1995.

FUKUYAMA, A. K.; SHIGENAKA, G.; HOFF, R. Z. Effects of residual *Exxon Valdez* oil on intertidal *Protothaca staminea*: Mortality, growth, and bioaccumulation of hydrocarbons in transplanted clams. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 40, n. 11, p. 1042-1050. 2000.

GABBOTT, P. A.; HEAD, E. J. H. Seasonal changes in the specific activities of the pentose phosphate pathway enzymes. G6PDH and 6PGDH and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in the bivalves *Mytilus edulis*, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Oxford, v. 66, n. 2, p. 279-284. 1980.

GAGNON, M. M.; HOLDWAY, D. A. Metabolic enzyme activities in fish gills as biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbons. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova York, v. 44, n. 1, p. 92-99. 1999.

GAINEY, L. F.; GREENBERG, M. J. Nitric oxide mediates seasonal muscle potentiation in clam gills. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 206, n. 19, p. 3507-3520. 2003.

GAMBELL, R. Whales in the Antarctic ecosystem. **Environment International**, Nova York, v. 13, n. 1, p. 47-54. 1987.

GIBSON, N.; MCALISTER-HENN, L. Physical and genetic interactions of cytosolic malate dehydrogenase with other gluconeogenic enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 28, p. 25628-25636. 2003.

GIN, K. Y. H.; KAMRUL HUDA, M.; KIAT LIM, W.; TKALICH, P. An oil spill-food chain interaction model for coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 42, n. 7, p. 590-597. 2001.

GONZÁLEZ-ALVAREZ, R.; ORTEGA-CUELLAR, D.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; MORENO-ARRIOLA, E.; VILLASEÑOR-MENDOZA, K.; GÁLVEZ-MARISCAL, A.; PÉREZ-CRUZ, M. E.; MORALES-SALAS, I.; VELÁZQUEZ-ARELLANO, A. The hexokinase gene family in the zebrafish: Structure, expression, functional and phylogenetic analysis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Oxford, v. 152, p. 189-195. 2009.

GORE, D. B.; REVILL, A. T.; GUILLE, D. Petroleum hydrocarbons ten years after spillage at a helipad in Bunger Hills, East Antarctica. **Antarctic Science**, Oxford, v. 11, n. 04, p. 427-429. 1999.

GOWARD, C. R.; NICHOLLS, D. J. Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis. **Protein Science**, Cold Spring Harbor, v. 3, n. 10, p. 1883-1888. 1994.

HANNAM, M. L.; BAMBER, S. D.; JOHN MOODY, A.; GALLOWAY, T. S.; JONES, M. B. Immunotoxicity and oxidative stress in the arctic scallop *Chlamys islandica*: Effects of acute oil exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova York, v. 73, n. 6, p. 1440-1448. 2010.

HIRD, F. J. R. The importance of arginine in evolution. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Oxford, v. 85, n. 2, p. 285-288. 1986.

HOARAU, P.; GNASSIA-BARELLI, M.; ROMEO, M.; GIRARD, J.-P. Differential induction of glutathione S-transferases in the clam *Ruditapes decussatus* exposed to organic compounds. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Nova York, v. 20, n. 3, p. 523-529. 2001.

HOCHACHKA, P. W.; MUSTAFA, T. Enzymes in facultative anaerobiosis of molluscs-I. Malic enzyme of oyster adductor muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 625-637. 1973.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. **Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution**. New York: Oxford University Press, 466. 2002.

HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; LAVOIE, D. R. .Ecotoxicology. In: DERELANKO, M. J.& HOLLINGER, M. A. (Ed.). **Handbook of Toxicology, Second Edition**. 2. Boca Raton: Informa Healthcare, 2001, p.872-916.

HOFFMAN, J.; PECK, L.; HILLYARD, G.; ZIERITZ, A.; CLARK, M. No evidence for genetic differentiation between Antarctic limpet *Nacella concinna* morphotypes. **Marine Biology**, Berlin, v. 157, n. 4, p. 765-778. 2010.

HOFFMAN, J. I.; CLARKE, A.; LINSE, K.; PECK, L. S. Effects of brooding and broadcasting reproductive modes on the population genetic structure of two Antarctic gastropod molluscs. **Marine Biology**, Berlin, v. 158, n. 2, p. 287-296. 2011.

IBARGUREN, I.; DIAZ-ENRICH, M. J.; CAO, J. S.; FERNANDEZ, M.; BARCIA, R.; VILLAMARIN, J. A.; RAMOS-MARTINEZ, J. N. I. Regulation of the futile cycle of fructose phosphate in sea mussel. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 126, n. 4, p. 495-501. 2000.

INGVARSDÓTTIR, A.; BJØRKBLOM, C.; RAVAGNAN, E.; GODAL, B. F.; ARNBERG, M.; JOACHIM, D. L.; SANNI, S. Effects of different concentrations of crude oil on first feeding larvae of Atlantic herring (*Clupea harengus*). **Journal of Marine Systems**, Amsterdam, v. 93, n. 0, p. 69-76. 2012.

IVANINA, A. V.; SOKOLOV, E. P.; SOKOLOVA, I. M. Effects of cadmium on anaerobic energy metabolism and mRNA expression during air exposure and recovery of an intertidal mollusk *Crassostrea virginica*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 330-342. 2010.

IYAMU, E. W.; ASAKURA, T.; WOODS, G. M. A colorimetric microplate assay method for high-throughput analysis of arginase activity in vitro. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v. 383, n. 2, p. 332-334. 2008.

JACKLET, J. Nitric oxide signaling in invertebrates. **Invertebrate Neuroscience**, Nova York, v. 3, n. 1, p. 1-14. 1997.

JANG, E. H.; PARK, H.; PARK, A. K.; MOON, J. H.; CHI, Y. M.; AHN, I. Y. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the p-class glutathione S-transferase from the Antarctic clam *Laternula elliptica*. **Acta**

Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, Chester, v. 64, n. 12, p. 1132-1134. 2008.

JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. Comparative properties of arginases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 114, n. 1, p. 107-132. 1996.

JENSEN, F. B. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: A comparative perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1787, n. 7, p. 841-848. 2009.

JIANG, Z.-Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384-389. 1992.

JIANG, Z.-Y.; WOOLLARD, A.; WOLFF, S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, Champaign, v. 26, n. 10, p. 853-856. 1991.

JING-JING, M.; LU-QING, P.; JING, L.; LIN, Z. Effects of benzo[a]pyrene on DNA damage and histological alterations in gonad of scallop *Chlamys farreri*. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 67, n. 1, p. 47-52. 2009.

JOBGEN, W. S.; FRIED, S. K.; FU, W. J.; MEININGER, C. J.; WU, G. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 17, n. 9, p. 571-588. 2006.

KARPUZOGLU, E.; AHMED, S. A. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: Implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 15, n. 3, p. 177-186. 2006.

KATZOFF, A.; BEN-GEDALYA, T.; SUSSWEIN, A. J. Nitric oxide is necessary for multiple memory processes after learning that a food is inedible in *Aplysia*. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 22, n. 21, p. 9581-9594. 2002.

KENNETT, J. P. Cenozoic evolution of Antarctic glaciation, the circum-Antarctic oceans and their impact on global paleoceanography. **Journal of Geophysical Research**, Washington, v. 82, p. 3843-3859. 1977.

KENNICUTT II, M. C.; MCDONALD, T. J.; DENOUX, G. J.; MCDONALD, S. J. Hydrocarbon contamination on the antarctic peninsula. I. Arthur Harbor - subtidal sediments. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 24, n. 10, p. 499-505. 1992a.

KENNICUTT II, M. C.; MCDONALD, T. J.; DENOUX, G. J.; MCDONALD, S. J. Hydrocarbon contamination on the antarctic peninsula. II. Arthur Harbor inter- and subtidal limpets (*Nacella concinna*). **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 24, n. 10, p. 506-511. 1992b.

KENNICUTT, I. I. M. Oil spillage in Antarctica: Initial report of the National Science Foundation-sponsored Quick Response Team on the grounding of the *Bahia Paraiso*. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 24, n. 5, p. 620-624. 1990.

KIM, D. **Seasonality of marine algae and grazers of an Antarctic rocky intertidal, with emphasis on the role of the limpet *Nacella concinna* Strebel (Gastropoda:**

Patellidae). 120 Berichte zur Polar- und Meeresforschung = Reports on polar and marine research, Bremen, Univ., Diss. 2001

KINSEY, S. T.; HARDY, K. M.; LOCKE, B. R. The long and winding road: influences of intracellular metabolite diffusion on cellular organization and metabolism in skeletal muscle. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 210, n. 20, p. 3505-3512. 2007.

KOEHLER, A.; ALPERMANN, T.; LAURITZEN, B.; VAN NOORDEN, C. J. F. Clonal xenobiotic resistance during pollution-induced toxic injury and hepatocellular carcinogenesis in liver of female flounder (*Platichthys flesus* (L.)). **Acta Histochemica**, Jena, v. 106, n. 2, p. 155-170. 2004.

KÖHLER, A.; VAN NOORDEN, C. J. F. Initial velocities in situ of G6PDH and PGDH and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA): sensitive diagnostic markers of environmentally induced hepatocellular carcinogenesis in a marine flatfish (*Platichthys flesus* L.). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 40, n. 2-3, p. 233-252. 1998.

KONO, Y. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Nova York, v. 186, n. 1, p. 189-195. 1978.

KORSMO, F. L. The Genesis of the International Geophysical Year. **Physics Today**, Nova York, v. 60, n. 7, p. 38-43. 2007.

LAM, P. K. S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean and Coastal Management**, Heights, v. 52, n. 7, p. 348-354. 2009.

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 182-186. 2003.

LARADE, K.; STOREY, K. B. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates. In: STOREY, K. B. & STOREY, J. M. (Ed.). **Cell and Molecular Response to Stress**. Maryland Heights: Elsevier, v. Volume 3, 2002, p. 27-46.

LAVARÍAS, S.; HERAS, H.; PEDRINI, N.; TOURNIER, H.; ANSALDO, M. Antioxidant response and oxidative stress levels in *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae) exposed to the water-soluble fraction of petroleum. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Oxford, v. 153, n. 4, p. 415-421. 2011.

LEISE, E. M.; KEMPF, S. C.; DURHAM, N. R.; GIFONDORWA, D. J. Induction of metamorphosis in the marine gastropod *Ilyanassa obsoleta*: 5HT, NO and programmed cell death. **Acta Biologica Hungarica**, Budapeste, v. 55, p. 293-300. 2004.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.-G.; AHN, B.-W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: LESTER PACKER, A. N. G. (Ed.). **Methods in Enzymology**. Nova York: Academic Press, v. 186, 1990, p. 464-478.

LIMA, I. S.; MOREIRA, S. M.; OSTEN, J. R. N.-V.; SOARES, A. M. V. M.; GUILHERMINO, L. C. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. **Chemosphere**, Oxford, v. 66, n. 7, p. 1230-1242. 2007.

LONG, S. M.; RYDER, K. J.; HOLDWAY, D. A. The use of respiratory enzymes as biomarkers of petroleum hydrocarbon exposure in *Mytilus edulis planulatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova York, v. 55, n. 3, p. 261-270. 2003.

LUCHMANN, K. H.; MATTOS, J. J.; SIEBERT, M. N.; GRANUCCI, N.; DORRINGTON, T. S.; BĂCEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; SASAKI, S. T.; DAURA-JORGE, F. G.; BAINY, A. C. D. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliensis* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 105, n. 3-4, p. 652-660. 2011.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Oxford, v. 143, p. 36-41. 2006.

MALANGA, G.; ESTEVEZ, M. S.; CALVO, J.; ABELE, D.; PUNTARULO, S. Oxidative stress in gills of limpets from the Beagle Channel: Comparison with limpets from the Antarctic. **Scientia Marina**, Barcelona, v. 69, n. SUPPL. 2, p. 297-304. 2005.

MARIA, V. L.; BEBIANNO, M. J. Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo[a]pyrene and copper. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Oxford, v. 154, n. 1, p. 56-63. 2011.

MARTINS, C. C.; BICEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; MONTONE, R. C. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Antarctic Science**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 117-122. 2004.

MARTINSON, D. G. Antarctic circumpolar current's role in the Antarctic ice system: An overview. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, Amsterdam, v. 335-336, n. 0, p. 71-74. 2012.

MASSOM, R. A.; STAMMERJOHN, S. E. Antarctic sea ice change and variability - Physical and ecological implications. **Polar Science**, Seattle, v. 4, n. 2, p. 149-186. 2010.

MCDONALD, S. J.; KENNICUTT II, M. C.; BROOKS, J. M. Evidence of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in fish from the Antarctic peninsula. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 25, n. 9-12, p. 313-317. 1992.

MICHAUD, L.; LO GIUDICE, A.; SAITTA, M.; DE DOMENICO, M.; BRUNI, V. The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experiment. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 49, n. 5-6, p. 405-409. 2004.

MORI, M.; GOTOH, T. Regulation of Nitric Oxide Production by Arginine Metabolic Enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 275, n. 3, p. 715-719. 2000.

MORLEY, S. A.; LURMAN, G. J.; SKEPPER, J. N.; PÖRTNER, H.-O.; PECK, L. S. Thermal plasticity of mitochondria: A latitudinal comparison between Southern Ocean

molluscs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Nova York, v. 152, n. 3, p. 423-430. 2009.

MOROZ, L. L.; GILLETTE, R. From Polyplacophora to Cephalopoda: comparative analysis of nitric oxide signalling in mollusca. **Acta Biologica Hungarica**, Budapest, v. 46, n. 2-4, p. 169-182. 1995.

MOROZ, L. L.; NOREKIAN, T. P.; PIRTLE, T. J.; ROBERTSON, K. J.; SATTERLIE, R. A. Distribution of NADPH-diaphorase reactivity and effects of nitric oxide on feeding and locomotory circuitry in the pteropod mollusc, *Clione limacina*. **The Journal of Comparative Neurology**, Weinheim, v. 427, n. 2, p. 274-284. 2000.

NAGAMI, H.; YOSHIMOTO, N.; UMAKOSHI, H.; SHIMANOUCHI, T.; KUBOI, R. Liposome-assisted activity of superoxide dismutase under oxidative stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 99, n. 4, p. 423-428. 2005.

NAHRGANG, J.; CAMUS, L.; CARLS, M. G.; GONZALEZ, P.; JÖNSSON, M.; TABAN, I. C.; BECHMANN, R. K.; CHRISTIANSEN, J. S.; HOP, H. Biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to the water soluble fraction of crude oil. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 234-242. 2010.

NEGRI, A.; BURNS, K.; BOYLE, S.; BRINKMAN, D.; WEBSTER, N. Contamination in sediments, bivalves and sponges of McMurdo Sound, Antarctica. **Environmental Pollution**, Barking, v. 143, n. 3, p. 456-467. 2006.

NEWCOMB, J. M.; WATSON, W. H. Modulation of swimming in the gastropod *Melibe leonina* by nitric oxide. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 205, n. 3, p. 397-403. 2002.

NIYOGI, S.; BISWAS, S.; SARKER, S.; DATTA, A. G. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 52, n. 1, p. 13-26. 2001.

OBERMÜLLER, B. E.; MORLEY, S. A.; CLARK, M. S.; BARNES, D. K. A.; PECK, L. S. Antarctic intertidal limpet ecophysiology: A winter-summer comparison. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 403, n. 1-2, p. 39-45. 2011.

ORTMANN, C.; GRIESHABER, M. K. Energy metabolism and valve closure behaviour in the Asian clam *Corbicula fluminea*. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 206, n. 22, p. 4167-4178. 2003.

OTITOLOJU, A.; OLAGOKE, O. Lipid peroxidation and antioxidant defense enzymes in *Clarias gariepinus* as useful biomarkers for monitoring exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, p. 1-9. 2011.

PALUMBO, A. Nitric oxide in marine invertebrates: A comparative perspective. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Nova York, v. 142, n. 2, p. 241-248. 2005.

PALUMBO, A.; D'ISCHIA, M. Nitric oxide biogenesis, signalling and roles in molluscs: The *Sepia officinalis* paradigm. In: BRUNO, T. & BARRY, T. (Ed.). **Advances in Experimental Biology**. Maryland Heights: Elsevier, v. 1, 2007, p.45-451.

PAN, L. Q.; REN, J.; LIU, J. Responses of antioxidant systems and LPO level to benzo[a]pyrene and benzo[k]fluoranthene in the haemolymph of the scallop *Chlamys farreri*. **Environmental Pollution**, Barking, v. 141, n. 3, p. 443-451. 2006.

PECK, L. S.; CONVEY, P.; BARNES, D. K. A. Environmental constraints on life histories in Antarctic ecosystems: tempos, timings and predictability. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 81, n. 1, p. 75-109. 2006.

PECK, L. S.; VEAL, R. Feeding, metabolism and growth in the Antarctic limpet, *Nacella concinna* (Strebel 1908). **Marine Biology**, Berlin, v. 138, n. 3, p. 553-560. 2001.

PEREIRA, C. D. S.; DE SOUZA ABESSA, D. M.; BAINY, A. C. D.; ZARONI, L. P.; GASPARRO, M. R.; BICEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; FURLEY, T. H.; DE SOUSA, E. C. P. M. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Nova York, v. 26, n. 3, p. 462-469. 2007.

PICKEN, G. B. The distribution, growth, and reproduction of the Antarctic limpet *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 71-85. 1980.

PICKEN, G. B.; ALLAN, D. Unique spawning behaviour by the Antarctic limpet *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 71, n. 3, p. 283-287. 1983.

POLAKOF, S.; ARJONA, F. J.; SANGIAO-ALVARELLOS, S.; MARTÍN DEL RÍO, M. P.; MANCERA, J. M.; SOENGAS, J. L. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. **Journal of Comparative Physiology Part B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, Nova York, v. 176, n. 5, p. 441-452. 2006.

POLAKOF, S.; MÍGUEZ, J. M.; SOENGAS, J. L. Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: Dependence on feeding. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Maryland Heights, v. 147, n. 2, p. 363-374. 2007.

PORTE, C.; SOLE, M.; ALBAIGÉS, J.; LIVINGSTONE, D. R. Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus sp.* to organic pollution. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, Oxford, v. 100, n. 1-2, p. 183-186. 1991.

PÖRTNER, H. O. Multicompartmental analyses of acid-base and metabolic homeostasis during anaerobiosis: invertebrate and lower vertebrate examples. In: HOCHACHKA, P. W.; LUTZ, P. L.; SICK, T.; ROSENTHAL, M. & DEN, T. G. V. (Ed.). **Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation**. Boca Raton: CRC Press, 1993, p.139-156.

PÖRTNER, H. O.; PECK, L.; ZIELINSKI, S.; CONWAY, L. Z. Intracellular pH and energy metabolism in the highly stenothermal Antarctic bivalve *Limopsis marionensis* as a function of ambient temperature. **Polar Biology**, Nova York, v. 22, n. 1, p. 17-30. 1999.

POWELL, S. M.; SNAPE, I.; BOWMAN, J. P.; THOMPSON, B. A. W.; STARK, J. S.; MCCAMMON, S. A.; RIDDLE, M. J. A comparison of the short term effects of diesel

fuel and lubricant oils on Antarctic benthic microbial communities. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 322, n. 1, p. 53-65. 2005.

QUINLAN, G. J.; GUTTERIDGE, J. M. C. Carbonyl assay for oxidative damage to proteins. In: TANIGUSHI, N. & GUTTERIDGE, J. M. C. (Ed.). **Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species**. New York: Oxford University, 2000, p.257 - 258.

RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. The hydrography of Admiralty Bay and its inlets, coves and lagoons (King George Island, Antarctica). **Polish Polar Research**, Łódź, v. 16, p. 61-70. 1995.

REGOLI, F.; NIGRO, M.; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; GORBI, S. Antioxidant efficiency in early life stages of the Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: Responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 43-52. 2005.

REGOLI, F.; PRINCIPATO, G. B.; BERTOLI, E.; NIGRO, M.; ORLANDO, E. Biochemical characterization of the antioxidant system in the scallop *Adamussium colbecki*, a sentinel organism for monitoring the Antarctic environment. **Polar Biology**, Nova York, v. 17, n. 3, p. 251-258. 1997.

REID, D. J.; MACFARLANE, G. R. Potential biomarkers of crude oil exposure in the gastropod mollusc, *Austrocochlea porcata*: laboratory and manipulative field studies. **Environmental Pollution**, Barking, v. 126, n. 2, p. 147-155. 2003.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. In: LESTER, P. (Ed.). **Methods in Enzymology**. Nova York: Academic Press, v.233, 1994, p.357-363.

RICHARDSON, B. J.; MAK, E.; DE LUCA-ABBOTT, S. B.; MARTIN, M.; MCCLELLAN, K.; LAM, P. K. S. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels "integrate" biomarker responses? **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 57, p. 503-514. 2008.

RODRIGUES, E.; GANNABATHULA, S. V.; LAVRADO, H. P. Nitrogen metabolism of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King & Broderip) and its potential use as biomarker. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 37-49. 2007.

RODRIGUES, E.; LAVRADO, H. P.; DONATTI, L.; SUDA, C. N. K.; RODRIGUES JR, E.; FEIJÓ DE OLIVEIRA, M.; VANI, G. S. Arginase kinetic characterization of the gastropod *Nacella concinna* and its physiological relation with energy requirement demand and the presence of heavy metals. **Annual Activity Report of National Institute of Science and Technology Antarctic Environmental Research**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 131-136. 2011.

RODRIGUES, E.; SANTOS, M. R. D. S.; RODRIGUES JUNIOR, E.; GANNABATHULA, S. V.; LAVRADO, H. P. Arginine metabolism of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King & Broderip, 1831): An ecophysiological approach. **Polar Biology**, Nova York, v. 32, n. 5, p. 691-702. 2009.

RODRIGUES, R. V.; MIRANDA-FILHO, K. C.; GUSMÃO, E. P.; MOREIRA, C. B.; ROMANO, L. A.; SAMPAIO, L. A. Deleterious effects of water-soluble fraction of

petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 9, p. 2054-2059. 2010.

ROGERS, A. D. Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v. 362, n. 1488, p. 2191-2214. 2007.

ROMERO-RUIZ, A.; AMEZCUA, O.; RODRÍGUEZ-ORTEGA, M. J.; MUÑOZ, J. L.; ALHAMA, J.; RODRÍGUEZ-ARIZA, A.; GÓMEZ-ARIZA, J. L.; LÓPEZ-BAREA, J. Oxidative stress biomarkers in bivalves transplanted to the Guadalquivir estuary after Aznalcóllar spill. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Nova York, v. 22, n. 1, p. 92-100. 2003.

RUNCIE, J. W.; RIDDLE, M. J. Metal concentrations in macroalgae from East Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 49, n. 11-12, p. 1114-1119. 2004.

SABOROWSKI, R.; BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, Berlin, v. 140, n. 3, p. 557-565. 2002.

SAMIULLAH, Y. Biological effects of marine oil pollution. **Oil and Petrochemical Pollution**, Maryland Heights, v. 2, n. 4, p. 235-264. 1985.

SANTOS, I. R.; SILVA-FILHO, E. V.; SCHAEFER, C. E. G. R.; ALBUQUERQUE-FILHO, M. R.; CAMPOS, L. S. Heavy metal contamination in coastal sediments and soils near the Brazilian Antarctic Station, King George Island. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 185-194. 2005.

SETZER, A. W.; OLIVEIRA, M. R.; FRANCELINO, M. R.; SCHAEFER, C. E. G. R.; COSTA, L. M. B., U. F. Regime Climático na Baía do Almirantado: Relações com o Ecossistema Terrestre. In: SCHAEFER, C. E. G. R. (Ed.). **Ecossistemas Costeiros e Monitoramento Ambiental da Antártica Marinha – Baía do Almirantado, Ilha Rei George**. Viçosa: Núcleo de Estudo de Planejamento e Uso da Terra – NEPUT, 2004, p.2-6.

SHRINGARPURE, R.; DAVIES, K. J. A. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. **Free Radical Biology and Medicine**, Nova York, v. 32, n. 11, p. 1084-1089. 2002.

SIEGERT, M. J.; FLORINDO, F. Antarctic Climate Evolution. In: FABIO, F. & MARTIN, S. (Ed.). **Developments in Earth and Environmental Sciences**. Maryland Heights: Elsevier, v.8, 2008, p.1-11.

SIMPFENDÖRFER, R. W.; OELCKERS, K. B.; LÓPEZ, D. A. Phosphofructokinase from muscle of the marine giant barnacle *Austromegabalanus psittacus*: Kinetic characterization and effect of in vitro phosphorylation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Oxford, v. 142, n. 3-4, p. 382-389. 2006.

SMITH, C. M.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. A. **Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach**. 2nd Edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 977. 2005.

SNAPE, I.; RIDDLE, M. J.; STARK, J. S.; COLE, C. M.; KING, C. K.; DUQUESNE, S.; GORE, D. B. Management and remediation of contaminated sites at Casey Station, Antarctica. **Polar Record**, Cambridge, v. 37, n. 202, p. 199-214. 2001.

STEFANO, G. B.; OTTAVIANI, E. The biochemical substrate of nitric oxide signaling is present in primitive non-cognitive organisms. **Brain Research**, Amsterdam, v. 924, n. 1, p. 82-89. 2002.

STROMGREN, T.; NIELSEN, M. V. Spawning frequency, growth and mortality of *Mytilus edulis* larvae, exposed to copper and diesel oil. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 21, n. 3-4, p. 171-179. 1991.

SUREDA, A.; BOX, A.; TEJADA, S.; BLANCO, A.; CAIXACH, J.; DEUDERO, S. Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the *Don Pedro* oil spill (Eivissa Island, Spain). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 101, n. 3-4, p. 540-549. 2011.

TAFALLA, C.; GÓMEZ-LEÓN, J.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. **Developmental & Comparative Immunology**, Nova York, v. 27, n. 3, p. 197-205. 2003.

TAIT, R. V.; DIPPER, F. A. **Elements of marine ecology**. 4. Oxford: Butterworth-Heinemann. 1998.

TAYLOR, B. E.; HARRIS, M. B.; BURK, M.; SMYTH, K.; LUKOWIAK, K.; REMMERS, J. E. Nitric oxide mediates metabolism as well as respiratory and cardiac responses to hypoxia in the snail *Lymnaea stagnalis*. **Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology**, Hoboken, v. 295A, n. 1, p. 37-46. 2003.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Plymouth, v. 85, n. 03, p. 603-611. 2005.

TIN, T.; FLEMING, Z. L.; HUGHES, K. A.; AINLEY, D. G.; CONVEY, P.; MORENO, C. A.; PFEIFFER, S.; SCOTT, J.; SNAPE, I. Impacts of local human activities on the Antarctic environment. **Antarctic Science**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 3-33. 2009.

TINTOS, A.; GESTO, M.; MÍGUEZ, J. M.; SOENGAS, J. L. β -Naphthoflavone and benzo[a]pyrene treatment affect liver intermediary metabolism and plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova York, v. 69, n. 2, p. 180-186. 2008.

TORRES, J. J.; SOMERO, G. N. Metabolism, enzymic activities and cold adaptation in Antarctic mesopelagic fishes. **Marine Biology**, Berlin, v. 98, n. 2, p. 169-180. 1988a.

TORRES, J. J.; SOMERO, G. N. Vertical distribution and metabolism in Antarctic mesopelagic fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Nova York, v. 90, n. 3, p. 521-528. 1988b.

TRIPATI, A.; BACKMAN, J.; ELDERFIELD, H.; FERRETTI, P. Eocene bipolar glaciation associated with global carbon cycle changes. **Nature**, Londres, v. 436, n. 7049, p. 341-346. 2005.

TSENG, F. S. Considerations in care for birds affected by oil spills. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, Philadelphia, v. 8, n. 1, p. 21-31. 1999.

TURJA, R.; SOIRINSUO, A.; BUDZINSKI, H. L. N.; DEVIER, M. H. L. N.; LEHTONEN, K. K. Biomarker responses and accumulation of hazardous substances in mussels (*Mytilus trossulus*) transplanted along a pollution gradient close to an oil terminal in the Gulf of Finland (Baltic Sea). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Oxford, v. 157, n. 1, p. 80-92. 2013.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Exeter, v. 39, n. 1, p. 44-84. 2007.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 57-149. 2003.

VAN NOORDEN, C. J. F.; BAHNS, S.; KÖHLER, A. Adaptational changes in kinetic parameters of G6PDH but not of PGDH during contamination-induced carcinogenesis in livers of North Sea flatfish. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v. 1342, n. 2, p. 141-148. 1997.

WALKER, A. J. M. Introduction to the ecology of the Antarctic limpet *Patinigera polaris* (Hombron and Jacquinot) at Signy Island, South Orkney Islands. **British Antarctic Survey Bulletin**, Cambridge, v. 28, p. 49-69. 1972.

WALLER, C. L.; WORLAND, M. R.; CONVEY, P.; BARNES, D. K. A. Ecophysiological strategies of Antarctic intertidal invertebrates faced with freezing stress. **Polar Biology**, Nova York, v. 29, n. 12, p. 1077-1083. 2006.

WEATHERHEAD, E. C.; ANDERSEN, S. B. The search for signs of recovery of the ozone layer. **Nature**, Londres, v. 441, n. 7089, p. 39-45. 2006.

WEIHE, E. **Adaptation and stress defence in intertidal and subtidal Antarctic limpets (*Nacella concinna*): A study of the plasticity of molecular and biochemical stress response in Antarctic invertebrates**. 135 Universitat Bremen, Bremen. 2009

WEIHE, E.; ABELE, D. Differences in the physiological response of inter- and subtidal Antarctic limpets *Nacella concinna* to aerial exposure. **Aquatic Biology**, Oldendorf/Luhe, v. 4, p. 155-166. 2008.

WEIHE, E.; KRIEWS, M.; ABELE, D. Differences in heavy metal concentrations and in the response of the antioxidant system to hypoxia and air exposure in the Antarctic limpet *Nacella concinna*. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 69, n. 3, p. 127-135. 2010.

WENDEHENNE, D.; PUGIN, A.; KLESSIG, D. F.; DURNER, J. R. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 177-183. 2001.

WIDDOWS, J.; BRINSLEY, M. Impact of biotic and abiotic processes on sediment dynamics and the consequences to the structure and functioning of the intertidal zone. **Journal of Sea Research**, Texel, v. 48, n. 2, p. 143-156. 2002.

WINZER, K.; VAN NOORDEN, C. J. F.; KÖHLER, A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: the key to sex-related xenobiotic toxicity in hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.)? **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 56, n. 4, p. 275-288. 2002.

WOOLFENDEN, E. N. M.; HINCE, G.; POWELL, S. M.; STARK, S. C.; SNAPE, I.; STARK, J. S.; GEORGE, S. C. The rate of removal and the compositional changes of diesel in Antarctic marine sediment. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 410-411, n. 0, p. 205-216. 2011.

ZACCARON DA SILVA, A.; ZANETTE, J.; FERNANDO FERREIRA, J.; GUZENSKI, J.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. D. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova York, v. 62, n. 3, p. 376-382. 2005.

ZACHER, K.; HANELT, D.; WIENCKE, C.; WULFF, A. Grazing and UV radiation effects on an Antarctic intertidal microalgal assemblage: a long-term field study. **Polar Biology**, Nova York, v. 30, n. 9, p. 1203-1212. 2007.

ZHANG, J. F.; WANG, X. R.; GUO, H. Y.; WU, J. C.; XUE, Y. Q. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova York, v. 58, n. 1, p. 110-116. 2004.